

Departamento de Química Física
Facultad de Química
Universidad de Sevilla



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DE
NANOTRANSPORTADORES FORMADOS POR
TENSIOACTIVOS DERIVADOS DE $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$**

Memoria del trabajo realizado por
José Antonio Lebrón Romero
Para optar al título de Doctor por la *Universidad de
Sevilla*.

SEVILLA, 2018

TESIS DOCTORAL
EN QUÍMICA
(QUÍMICA FÍSICA)

Fdo. José Antonio Lebrón Romero

M^a DEL PILAR LÓPEZ CORNEJO Y M^a LUISA MOYÁ MORÁN

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla.

Fdo. M ^a del Pilar López Cornejo Catedrática de Universidad del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla	Fdo. M ^a Luisa Moyá Morán Catedrática de Universidad del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla
---	---

JAIME OVIEDO LÓPEZ, Profesor Titular y Director del
Departamento de Química Física de la Universidad de
Sevilla,

Que la tesis doctoral titulada **“Síntesis, caracterización y aplicaciones de nanotransportadores formados por tensioactivos derivados de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ”**, presentada por D. José Antonio Lebrón Romero para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Física de dicha Universidad, bajo la dirección de las profesoras D^a M^a del Pilar López Cornejo y D^a M^a Luisa Moyá Morán.

Sevilla, de octubre de 2018

Fdo. Jaime Oviedo López

Índice de símbolos abreviaturas

DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin 1-etanosulfónico
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ARNip	ácido ribonucleico pequeño de interferente.
Å	angstrom.
EtBr	bromuro de etidio.
Z_{eff}	carga efectiva.
α -CD	α -ciclodextrina.
β -CD	β -ciclodextrina.
CD	ciclodextrina.
γ -CD	γ -ciclodextrina.
CDs	ciclodextrinas.
NaCl	cloruro sódico
CMC	concentración micelar crítica.
CVC	concentración vesicular crítica.
δ	desplazamiento químico.
DOX	doxorrubicina.
DRX	difracción de rayos X.
P	empaquetamiento.
PF	factor de empaquetamiento.
I	fuerza iónica.
IE	intensidad de emisión.
LS180	línea celular de humano de cáncer de colon.

MCF7	línea celular de humano de cáncer de mama.
HepG-2	línea celular de humano de cáncer hepático.
A549	línea celular de humano de cáncer pulmonar.
RPE-1	línea celular de humano sanas.
MVV	liposoma multivesicular.
GUV	liposomas unilamelares gigantes.
LUV	liposomas unilamelares grande.
SUV	liposomas unilamelares pequeñas.
λ	longitud de onda.
AFM	microscopia de fuerza atómica.
TEM	microscopia de transmisión electrónica.
nm	nanómetro
pb	pares de bases.
ppm	partes por millón
ζ	potencial zeta.
RMN	resonancia magnética nuclear.
CMC*	segunda CMC o cambio conformacional.
CTML	transferencia de carga de metal a ligando.
θ_{obs}	elipticidad molar observada.

Resumen

En la presente Tesis Doctoral se han sintetizado cuatro metalosurfactantes derivados del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, donde se han variado el número de cadenas hidrofóbicas y la longitud de las mismas. Se han caracterizado los tensioactivos y se ha estudiado su proceso de agregación. Posteriormente se ha investigado la interacción entre los monómeros y los agregados de los metalosurfactantes con el ADN, al que compactan, pasando de una conformación elongada a una forma de ovillo. Se han determinado las constantes de interacción entre los metalosurfactantes y las α -, β -, y γ -ciclodextrinas. Se observa la formación de complejos de inclusión estables, lo que permitiría usar las ciclodextrinas para decompactar el ADN. Se han preparado también metaloliposomas y se han caracterizado los complejos liposoma/ADN o lipoplejos, en los que el polinucleótido está compactado. Los estudios de viabilidad celular realizados confirman que los metalosurfactantes tienen propiedades antineoplásicas. Como monómeros, presentan baja toxicidad a concentraciones bajas, mientras que las micelas presentan citotoxicidad elevada. Sólo en el caso de los metaloliposomas se encuentra, a concentraciones intermedias, que las células sanas prácticamente no se ven afectadas, mientras que para las líneas celulares cancerígenas son citotóxicos. Estudios de internalización celular indican una elevada internalización de las metalomicelas.

Por último, las metalomicelas y los metaloliposomas se han usado como nanotransportadores de un agente antineoplásico como la doxorrubicina, observándose altos porcentajes de encapsulación de este fármaco, especialmente en los liposomas.

Índice de símbolos y abreviaturas	<i>i</i>
Resumen	iii
1 Introducción.....	5
1.1 Transporte de medicamentos.....	7
1.2 Terapia génica.	11
1.3 Información genética.	14
1.3.1 ADN.	14
1.4 Moléculas anfifílicas.	19
1.5 Agregación de moléculas anfifílicas	24
1.6 Liposomas.....	27
1.6.1 Clasificación.....	29
1.6.2 Síntesis:.....	30
1.7 Empleo de monómeros y agregados de moléculas anfifílicas como vectores de ADN.....	33
1.7.1 Interacción de ADN con monómeros de tensioactivos.....	34
1.7.2 Interacción del ADN con micelas.....	41
1.7.3 Interacción de ADN con liposomas, formación del lipoplejo.	42
1.8 Objetivos.	46
1.9 Bibliografía.	47
2 Materiales y métodos	53
2.1 Los reactivos usados en la realización de esta tesis doctoral son los siguientes:	55
2.2 Técnicas experimentales.	63
2.3 Bibliografía.	77
3 Complejo de inclusión (pseudorrotaxano)	79
3.1 Experimental.	87
3.2 Resultados y discusión	89
3.3 Conclusiones.....	108

3.4	Bibliografía	109
4	Monómeros de metalosurfactantes y su interacción con ADN	115
4.1	Experimental.	121
4.2	Resultados y discusión.	123
4.3	Conclusiones.....	148
4.4	Bibliografía	149
5	Metalomicelas y su interacción con ADN.	153
5.1	Preparación de muestras.	159
5.2	Resultados y discusión	162
5.3	Conclusiones.....	184
5.4	Bibliografía.	185
6	Metaloliposomas y su interacción con ADN	189
6.1	Parte experimental.....	194
6.2	Resultados y discusión.	199
6.3	Conclusiones.....	221
6.4	Bibliografía.....	222
7	Aplicaciones de metalosurfactante y sus agregados	227
7.1	Preparación de disoluciones.	232
7.2	Resultados y discusión	234
7.3	Conclusiones.....	249
7.4	Bibliografía	250
8	Conclusiones.	255
	Publicaciones en revistas científicas:	261

Índice de Esquemas.	263
Índice de Figuras.	265
Índice de Tablas.	269

Capítulo 1º.

Introducción

En las últimas décadas, la medicina ha experimentado un gran avance en el desarrollo de medicamentos, así como en el diseño de nuevos transportadores para estos, que permitan aumentar su actividad terapéutica, además de reducir los efectos secundarios. Otro de los campos de interés se centra en detectar la presencia de biomoléculas, para lo que se requiere la preparación de nuevos biosensores, como por ejemplo la detección de ADN empleando medidas de fluorescencia¹. Esta evolución se ve reflejada en los avances en el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades. Muchos de estos avances han ido paralelos al desarrollo y aplicación de sistemas “nano” a la medicina (caracterizados por tener un tamaño comprendido entre 1 y 999 nm)², apareciendo una nueva rama de la ciencia de la salud. Esta nueva rama del conocimiento se denomina Nanomedicina.

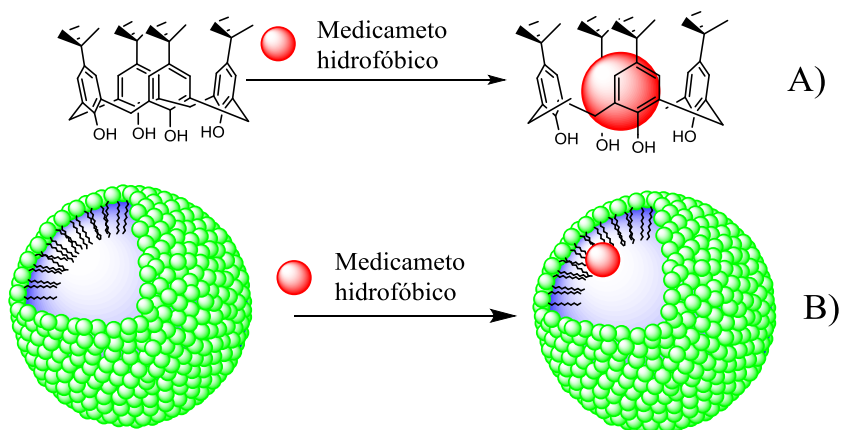
En el campo de estudio sobre la acción terapéutica de medicamentos, la Nanomedicina se centra en el desarrollo de nuevos nanotransportadores de fármacos. Cuando lo que se transporta es material genético, suelen recibir el nombre de vectores. Los recientes avances de la Nanomedicina se fundamentan en la rápida evolución de la nanotecnología, un campo multidisciplinar que comprende áreas como biología, química, física, ciencia de materiales, ingeniería, medicina, etc.

1.1 Transporte de medicamentos.

En la actualidad, una gran parte de los medicamentos empleados en el tratamiento de enfermedades son hidrofóbicos. El método de administración, ya sea por vía parenteral u oral, implica la necesidad de que estas drogas sean solubles en disolventes polares. Para ello se están usando moléculas que actúan como vehículos y poder así llevar los medicamentos de una forma más efectiva a la zona donde son necesarios.

Los compuestos más empleados como nanotransportadores en este tipo de tratamientos son las moléculas macrocíclicas, por ejemplo, calixarenos⁸, ciclodextrinas⁹, etc., aunque también se están usando algunos agregados de moléculas anfifílicas^{10,11}. Todos ellos presentan una cavidad de cierto carácter hidrofóbico, pero el exterior normalmente es hidrofílico. Esto permite a estas especies formar un complejo con el medicamento que les proporciona una mayor solubilidad en entornos polares.

Como se ve en el esquema 1.1, el medicamento se localiza en la cavidad de la molécula que actúa como transportador. El fármaco no tiene que localizarse totalmente en el interior de la cavidad del vector empleado. Basta en muchos casos con que ocurra un acoplamiento parcial¹².



Esquema 1.1. Modelo de nanotransportador de medicamentos, calixareno A) y micelas B).

Entre los fármacos para los que se han utilizado más frecuentemente los nanotransportadores se encuentran las drogas antineoplásicas, como por ejemplo la doxorrubicina. Para su transporte se han utilizado micelas mixtas poliméricas, liposomas y ciclodextrinas⁶. Otro de los fármacos que de forma

habitual se administra mediante el uso de nanotransportadores es el material genético. En este caso se habla de tratamientos de terapia génica, como el transporte de ARN a las células cancerosas de pulmón⁷. La terapia génica es un caso particular del transporte de medicamentos donde se emplea un fragmento de información genética como fármaco y el nanotransportador recibe el nombre de vector. Esta terapia se usa tanto para enfermedades adquiridas como genéticas, y se utiliza cuando se pretende reparar una información genética defectuosa o ausente en una célula.

Como en esta memoria se estudiará la efectividad de nuevos compuestos para el transporte de material genético, nos ocuparemos, fundamentalmente, de los vectores. Los métodos de administración de material genético se pueden clasificar esencialmente en dos categorías: métodos físicos y métodos químicos.

Métodos físicos: no necesitan del uso de vectores, pero si requieren la utilización de un estímulo externo ya sea mecánico o eléctrico. Estos métodos tienen algunas limitaciones como puede ser:

Requiere una gran cantidad de *medicamento*.

Se somete a las células a un gran estrés.

Se necesita mucho tiempo para que la administración sea efectiva.

- Métodos químicos: requieren el empleo de vectores.

Los vectores empleados en los métodos químicos se pueden dividir, a su vez, en dos grandes grupos como son los virales y los no virales. Los vectores víricos (o virales) son las cápsulas de un virus^{3,4} a los cuales se les ha extraído todo su contenido y se emplea el espacio (o cavidad) creado para insertar el material genético⁵. El principal inconveniente del uso de virus como vectores es la posible respuesta inmunológica que pueda darse por parte del organismo, además de los efectos que pueden provocar en las células a los que van

dirigidos. Por el contrario, los vectores no virales son *a priori* los que menos efectos secundarios tienen.

Los vectores no virales suelen ser moléculas cíclicas o agregados de moléculas anfipáticas. Estos vehículos normalmente se caracterizan por tener regiones que presentan diferente polaridad. Algunos ejemplos de estos vectores son: nanopartículas de distinta naturaleza, ciclodextrinas, calixarenos y tensioactivos catiónicos, así como liposomas, vesículas y micelas en las que están presentes los dos últimos.

En la tabla 1.1 se muestra un resumen de los distintos métodos y vectores que se pueden emplear para facilitar el transporte de material genético hasta el lugar requerido, que actúa como diana. También se aportan en la tabla algunos ejemplos de los distintos métodos.

Tabla 1.1. Una clasificación de los métodos de transporte según la naturaleza del proceso.

Tipo	Vector empleado	Ejemplo
Físico		Electroporación Microinyección
	Virales	Retrovirus Adenovirus
	No virales	Tensioactivos catiónicos Liposomas Calixarenos

1.2 Terapia génica.

Un caso particular del transporte de medicamentos es en el que la molécula conducida es un fragmento de material genético. Este método recibe el nombre de terapia génica. Aunque existen varias definiciones de terapia génica quizás la más completa es la que la define como el conjunto de técnicas que se requieren para introducir una secuencia de material genético (ácido nucleico) en el interior de células diana, con el fin de reparar una información genética dañada o ausente^{13,14}. La necesidad de emplear un vector en este tipo de tratamiento se debe principalmente a varios factores (ver Esquema 1.2):

-El tamaño del polinucleótido¹⁵: la información genética se encuentra en el ADN, que en condiciones fisiológicas adquiere una conformación de doble hélice alargada (random coil), lo que impide que pueda entrar de forma directa en las células debido a su tamaño.

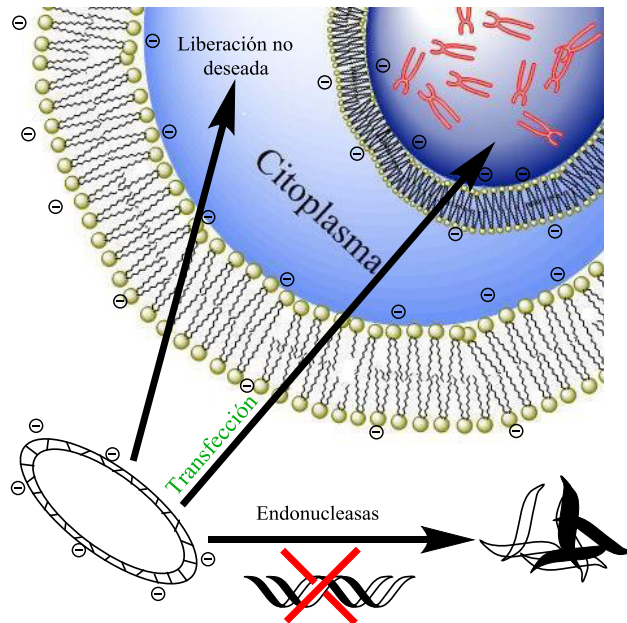
-La repulsión entre ADN y la membrana celular¹⁶: el polinucleótido tiene grupos fosfato orientados hacia la parte externa del ADN, que se encuentran cargados negativamente. Por otro lado, la membrana lipídica de las células también se encuentra cargada negativamente, lo que provoca la repulsión del polinucleótido.

-La acción de las endonucleasas sobre el ADN^{17,18}: las endonucleasas son unas enzimas que fragmentan el polinucleótido, cortando los enlaces fosfodiéster de forma inespecífica. La acción de estas enzimas lleva implícita la pérdida de la información genética que se quiere administrar a las células objetivo o diana.

-La liberación de la información genética: el último paso de la terapia génica consiste en la liberación de la información genética en el núcleo celular objetivo del tratamiento. Hay ocasiones en las que el material genético se

libera en el citoplasma, impidiendo completarse el proceso final de la terapia (la transfección), que consiste en introducir el material genético externo a la célula en el núcleo, e incorporarse al material genético de la célula diana.

Este tratamiento se empezó a desarrollar en la década de los setenta, cuando se decidió tratar las enfermedades genéticas de una forma diferente al introducir ADN exógeno (ADN externo al organismo que se introduce en este) en cultivos de células eucariotas de mamíferos. Debido a problemas éticos y al momento en el que se encontraba el desarrollo de la biología molecular de la época, fue imposible la obtención de resultados satisfactorios. En la primera mitad de los años noventa se produjo un gran avance en la terapia génica debido principalmente a dos hechos: por un lado, se efectuaron cambios en la legislación sobre este tipo de tratamientos, y por otro lado, se produjo la aplicación y el desarrollo de la nanotecnología en la terapia génica.



Esquema 1.2. Introducción del material genético en el núcleo de una célula y las barreras fisiológicas que se pueden encontrar para este proceso.

En la actualidad, el proceso de incorporar material genético a las células ha pasado a ser un tratamiento muy empleado además de un proceso muy eficaz. Sin embargo, a día de hoy aún existen etapas de esta técnica que requieren ser sometidas a estudio en profundidad para conseguir un mayor desarrollo científico. Por ello se ha de comprender mejor el papel que desempeñan algunas moléculas en el transcurso de ciertas enfermedades. Los principales requisitos que han de cumplir este tipo de tratamientos para su buen desarrollo y aceptación son: una mayor eficiencia, además de una seguridad y selectividad en el proceso de introducir información genética en un organismo.

Son varios los campos en los que aún se puede avanzar en el desarrollo de la terapia génica. Estos campos son:

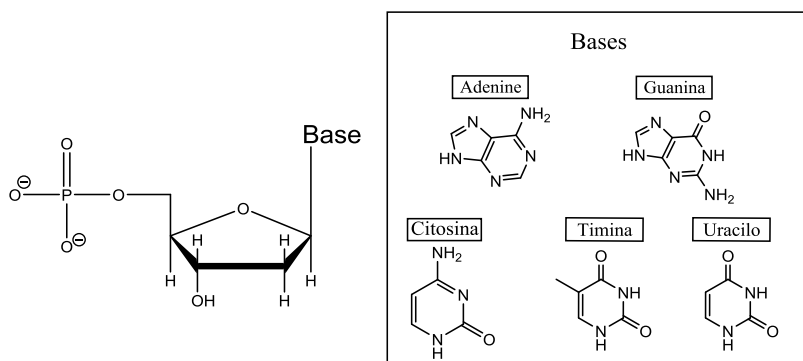
- Síntesis y optimización de nuevos vectores para este tratamiento que proporcionen una mayor eficiencia a la terapia génica.
- Optimización del tratamiento, para ello se requiere conocer en profundidad todas las etapas en las que se divide la terapia génica y mejorar su rendimiento.

1.3 Información genética.

Teniendo en cuenta que toda la información genética de un individuo se encuentra contenida en la secuencia de bases que constituyen el ADN, y que este no puede atravesar ni la membrana celular ni la nuclear en su conformación más habitual, es importante dedicar un apartado de esta tesis al estudio de este polinucleótido.

1.3.1 ADN.

El ADN es un polinucleótido, es decir, un polímero cuyo monómeros son los nucleótidos. Estos nucleótidos están formados por bases nitrogenadas unidas a un azúcar que, a su vez, se encuentra unido a un grupo fosfato (ver Esquema 1.3). El azúcar es una pentosa que tiene unida una base en su posición 1. Éstas pueden ser de dos tipos: purínicas y pirimidínicas. Las purínicas son adenina y guanina, las pirimidínicas son citosina y timina (cuando se habla de ARN se cambia la timina por uracilo). En la posición 5 del azúcar podemos encontrar un grupo fosfato¹⁹.

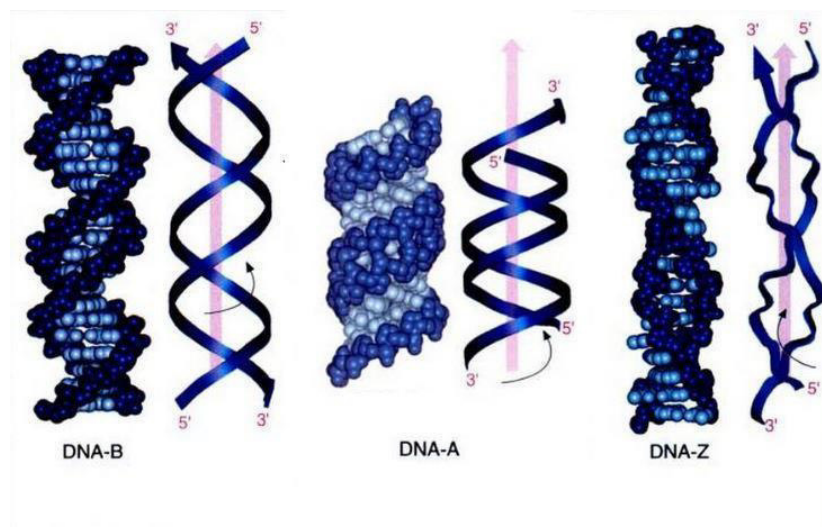


Esquema 1.3. Estructura de un nucleótido general además de las bases nitrogenadas que forman para el ADN y ARN.

Los nucleótidos se unen mediante enlaces fosfodiéster entre la posición 5 de una de las pentosas y la posición 3 de la pentosa adyacente. En los organismos vivos, el ADN no suele existir como un polinucleótido aislado, sino como una pareja de moléculas estrechamente asociadas. Las dos cadenas que forman el ADN se enroscan sobre sí mismas formándose una doble hélice.

El ADN existe en muchas conformaciones. Sin embargo, en organismos vivos sólo se han observado las conformaciones A-ADN, B-ADN y Z-ADN (ver Esquema 1.4.). La conformación "B" es la más común en las condiciones existentes en las células (condiciones fisiológicas²⁰).

En la conformación B, las hebras se pueden describir como una hélice que gira hacia la derecha. Con baja humedad, la forma B cambia a la forma A (también gira hacia la derecha), esta es una forma compacta y presenta 11 bases por vuelta a diferencia de las 10.5 que presenta la forma B. La conformación A es poco frecuente ya que sólo existe en alta deshidratación.



Esquema 1.4. Estructura de las distintas conformaciones que pueden adquirir el ADN.

La conformación Z-ADN muestra un giro hacia la izquierda al contrario que las formas A y B. La distancia entre los pares de bases en la conformación Z (0.77 nm) es mayor que la observada para la B-ADN (0.34 nm). En condiciones fisiológicas la transición de B-ADN a Z-ADN es poco probable, esta se ve favorecida si una citosina se metila en la posición 5 (C5)²¹.

Como se ha dicho anteriormente la estructura alargada del ADN no es la idónea para la terapia génica debido a su gran tamaño. Es por ello que se buscan otras alternativas como pueden ser los plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular. Estas moléculas tienen un tamaño pequeño, conteniendo entre 3000-10000 pb (pares de bases). Este ADN cíclico tiene una autorreplicación que es independiente de la replicación cromosómica²². Un caso particular de plásmido son los llamados episomas, que pueden encontrar libres, como el

resto de los plásmidos, o se pueden incorporar a los cromosomas y replicarse cuando la célula lo haga.

Un sistema sencillo de clasificar a los plásmidos consiste en determinar si su replicación se encuentra sometida a un control restringido o relajado. Los plásmidos restringidos se encuentran en pequeño número en las células en crecimiento activo (hasta un máximo de 8 por cromosoma), mientras que los de control relajado pueden encontrarse en un gran número (20 o más por cromosoma)²³.

Otra posible clasificación es aquella que tiene en cuenta su función biológica. Según este criterio podemos encontrar:

- Plásmidos de fertilidad. Los cuales contienen transgenes, que son genes relacionados con la capacidad de conjugación²⁴.

- Plásmidos de resistencia. Contienen genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos para evitar así, que puedan matar a las células huésped²⁴.

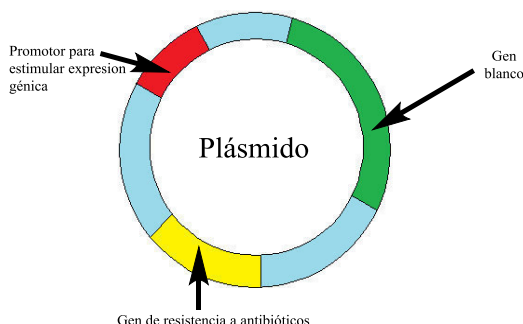
- Plásmidos degradativos. Contienen información genética que promueve la digestión de sustancias inusuales como tolueno o ácido salicílico.

- Plásmidos virulentos. Contienen genes que incrementan la virulencia de una bacteria, haciéndola mucho más perjudicial que en ausencia del plásmido.

- Plásmidos metabólicos. Llevan información genética que interviene en procesos metabólicos como fijar nitrógeno en plantas.

Los plásmidos son moléculas relativamente fáciles de modificar, ya que se puede reemplazar el gen que transportan (gen en blanco en el Esquema 1.5) por otro que contenga la información genética que se desea.

En resumen, la propiedad de autorreplicación y la facilidad para modificar el gen que transporte son los factores principales que avalan el uso de plásmidos en los procesos de la terapia génica.



Esquema 1.5. Imagen general de un plásmido.

Pese a todo esto el empleo de plásmidos tiene algunas desventajas como es el transporte de información no deseada. El plásmido no se encuentra únicamente constituido por la información genética que se desea sino que posee fragmentos que pueden afectar al buen funcionamiento de las células, como por ejemplo promotores y amplificadores de secuencias.

La introducción en la célula de información genética adicional a la que se desea puede generar efectos secundarios negativos, como son:

- i) Afectar al proceso de transcripción génica: estos fragmentos pueden intervenir en el proceso de síntesis del ARN mensajero, lo que puede resultar en una mala producción de proteínas.
- li) Generar respuestas inmunes: la presencia de moléculas extrañas en el interior de una célula puede generar una respuesta inmunológica. Estas moléculas son el resultado de la síntesis de proteínas a partir de genes no deseados.

Se puede hacer una clasificación de los sistemas vector/medicamento atendiendo a dos factores. Por un lado a la naturaleza del vector empleado en

el tratamiento y por otro lado a la naturaleza de la molécula usada como medicamento. Se procede a realizar un estudio de un caso particular de estos sistemas que es aquel que emplea como vector moléculas anfifílicas o agregados de estas.

1.4 Moléculas anfifílicas.

En la naturaleza existen moléculas que no se pueden clasificar estrictamente en moléculas polares o apolares, ya que poseen ambas cualidades a la vez. Este tipo de especies se denominan moléculas anfifílicas o anfipáticas y se encuentran constituidas por dos partes:

- Parte liófila que está formada por una cabeza polar y presenta una gran afinidad por los disolventes polares.

- Parte liófoba que suele estar constituida por una, dos o tres cadenas hidrocarbonadas y presentan poca afinidad por los disolventes polares.

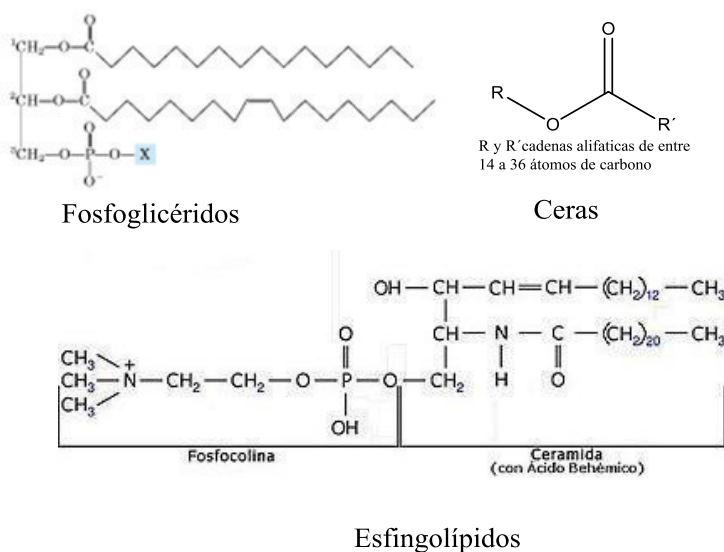
Cuando el disolvente en el que se encuentran disueltos es el agua, ambas partes se denominan parte hidrófila e hidrófoba respectivamente. Un ejemplo de moléculas anfifílicas son los lípidos.

Los lípidos son moléculas orgánicas naturales, solubles en alta proporción en disolventes apolares como son el éter dietílico, el cloroformo, el metanol, etc. Una parte característica de la estructura de estas moléculas es la parte hidrofóbica, esta parte normalmente constituida por una cadena alifática lineal.

Los lípidos se pueden clasificar de distinta forma atendiendo a las diferencias en su estructura y propiedades químicas, por ejemplo, ser o no saponificables, tener o no dobles enlaces en la cadena alifática, fuente y

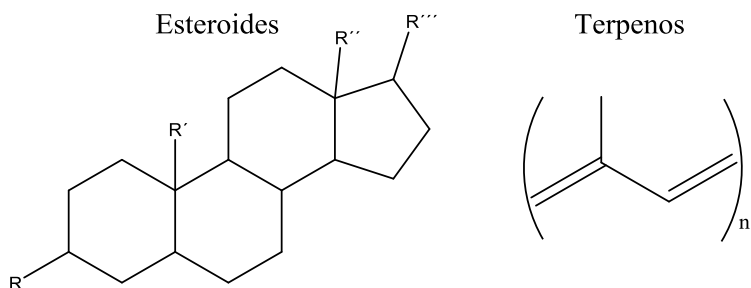
aspecto entre otros. En general, los lípidos se pueden clasificar en dos tipos: simples y complejos²⁵.

- Lípidos complejos: son los que contienen ácidos grasos en su estructura unidos a un -OH de otra molécula. Esta unión se rompe en condiciones básicas y calor, dando como resultado la sal del ácido graso y el correspondiente alcohol. A este proceso se le conoce con el nombre de saponificación. Ejemplos de este tipo de lípidos son los fosfoglicéridos, las ceras y los esfingolípidos (ver Esquema 1.6).

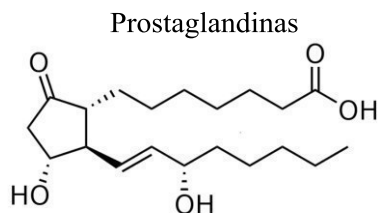


Esquema 1.6. Lípidos complejos.

- Lípidos simples: son aquellos que no pueden ser saponificados ya que carecen de la unión que se ha descrito anteriormente. Ejemplos de lípidos simples son los esteroides, terpenos y las prostaglandinas (ver Esquema 1.7).



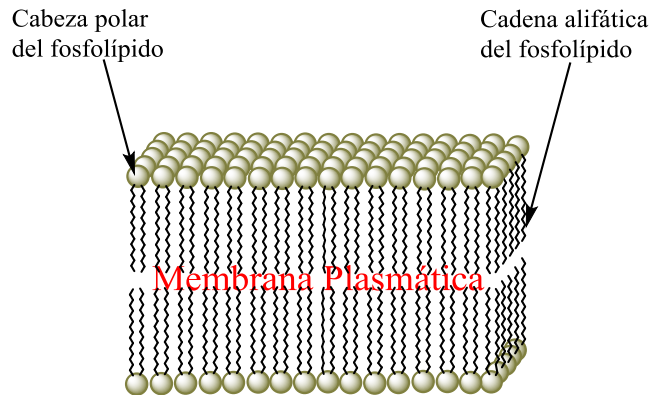
R, R', R'' y R''' son los sustituyentes que
diferencia los distintos esteroides



Esquema 1.7. Lípidos simples.

Los lípidos intervienen en algunos procesos biológicos como el almacenamiento de energía. También forman parte de la estructura de las células e intervienen en procesos de señalización molecular.

Todas las membranas plasmáticas de las células poseen una bicapa de fosfolípidos, con la cabeza polar orientada hacia la parte externa de la estructura en contacto con las moléculas de agua. Por el contrario, las cadenas alifáticas de los fosfolípidos se orientan hacia el interior de la bicapa (ver Esquema 1.8). La estructura de esta bicapa se mantiene unida por interacciones de tipo no covalente.



Esquema 1.8. Asociación de los fosfolípidos para la formación de la membrana plasmática de una célula.

Un tipo de moléculas anfifílicas son las que se denominan tensioactivos.

Los tensioactivos son moléculas que reducen la tensión superficial o interfacial de dos fluidos inmiscibles. Las partes que forman un tensioactivo son:

- Parte hidrofóbica: Normalmente se trata de una cadena alifática, aunque puede tener algún sustituyente en el extremo opuesto al de la parte hidrofílica (cabeza de tensioactivo). Esta parte del tensioactivo se denomina cadena del tensioactivo.
- Parte hidrofílica: Normalmente se trata de un grupo polar, que se encuentra unido covalentemente a la cadena alifática.

Hay diferentes clasificaciones para las moléculas de tensioactivos una de ellas es la que divide estas moléculas en función de la carga o no que presente el grupo de cabeza. Por lo tanto las moléculas anfifílicas puede ser²⁶:

- Aniónicos: Son moléculas que poseen carga negativa en la parte hidrofílica. Estas moléculas presentan capacidad espumante.

- Catiónicos: Son moléculas que poseen carga positiva en la parte hidrofílica y suelen caracterizarse por una capacidad espumante menor que los aniónicos.
- Anfóteros o zwitteriónicos: Este tipo de moléculas tiene como grupo de cabeza especies que tienen la capacidad de variar la carga según el pH del medio.
- No iónicos: No presentan carga, son poco solubles en disolventes polares. Muchas de estas moléculas suelen ser biodegradables.

Además de esta clasificación se pueden hacer otra división de los tensioactivos en función de la cadena alifática que los constituyen y se clasifican según tengan como parte hidrófoba una:

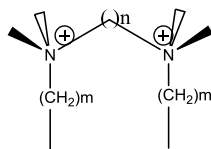
-Cadena hidrocarbonada como por ejemplo alcanos, alquenos hidrocarburo aromáticos, etc.

-Cadena alquil éter como por ejemplo etoxi, propoxi, etc.

-Cadena fluorocarbonada.

En la actualidad se están preparando nuevos tensioactivos como los tensioactivos policatenarios, que tienen varias cadenas lipófilas, o los metalosurfactantes.

Un tipo de tensioactivo policatenario son los llamados tensioactivos diméricos, que poseen dos grupos lipófilos y dos grupos hidrófilos en la misma molécula. Los dos grupos hidrófilos se encuentran unidos por un espaciador que puede variar de longitud (ver Esquema 1.9). Cuando las dos colas y las dos cabezas son iguales, se llaman tensioactivos gémíni.



Esquema 1.9. Estructura típica de un tensioactivo gémini cuya cabeza es un grupo amonio cuaternario.

Los metalosurfactantes se caracterizan por tener como parte polar un metal o un complejo metálico²⁶. La presencia de estos metales, generalmente elementos de la serie de transición, proporciona a este tipo de moléculas una serie de propiedades, como son: paramagnetismo, color, sensibilidad al pH, actividad catalítica y propiedades redox²⁷. Se pueden encontrar en la bibliografía metalosurfactantes derivados de hierro^{28,29}, cobalto³⁰, cromo³¹, paladio³², molibdeno³³ y rutenio^{27,34}, entre otros.

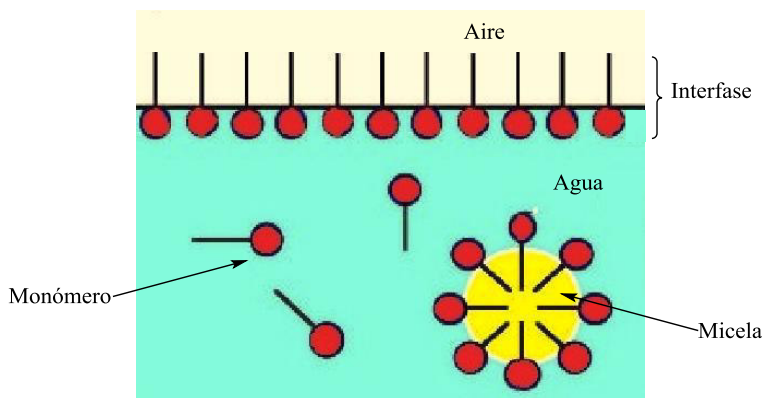
Los tensioactivos suelen tener la capacidad de auto-agregarse. Se pueden observar micelas esféricas, cilíndricas y vesículas.

La carga positiva de los tensioactivos catiónicos, siempre que sean biocompatibles, hacen de estas moléculas buenos candidatos para su empleo como vectores.

1.5 Agregación de moléculas anfifílicas

Debido a la estructura que presentan las moléculas anfifílicas, éstas se localizan en la interfase entre dos disolventes inmiscibles o en la interfase aire-agua, disponiéndose la cabeza hidrofílica hacia el agua y la parte hidrofóbica hacia la otra fase (ver Esquema 1.10). Una vez que la interfase está saturada, las moléculas anfifílicas se localizan en el agua como moléculas aisladas, denominadas monómeros. Esta situación no se encuentra favorecida

termodinámicamente debido a la poca afinidad entre las moléculas de agua y la parte lipófila. Las moléculas anfifílicas se autoagregan para reducir las repulsiones entre la parte hidrofóbica de estos y las moléculas de agua.



Esquema 1.10. Moléculas anfifílicas en disolución acuosa.

Cuando aumenta la concentración de monómeros en disolución, estos tienden a formar agregados dado que en ellos las colas lipófilas se encuentran en el interior, evitando el contacto con el agua, y las cabezas polares en la superficie del agregado, en contacto con el agua. Este proceso de auto-agregación está muy favorecido termodinámicamente. Se pueden formar distintos tipos de agregados, pero los más comunes son las micelas. Se tratan de agregados esféricos en los que las cabezas de las moléculas anfifílicas se encuentran orientadas hacia el disolvente, mientras que las cadenas alifáticas se encuentran en el interior de las micelas. La formación de estos agregados se produce cuando se supera una determinada concentración de monómeros en disolución. Este valor se conoce como concentración micelar crítica (CMC). Es importante decir de las micelas no son unos agregados “estáticos”, existe un equilibrio dinámico monómeros-micelas.

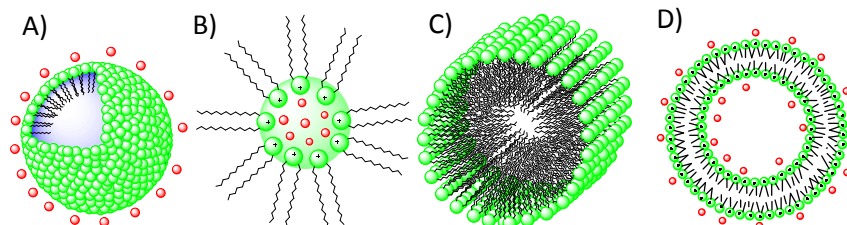
Como se comentó anteriormente, las micelas esféricas no son la única estructura en la que se pueden asociar los monómeros. A continuación describimos algunas de ellas (ver Esquema 1.11).

-micelas directas: descritas anteriormente (Esquema 1.11. Imagen A).

-Micelas inversas: Cuando moléculas anfifílicas se encuentran en un medio apolar, como por ejemplo aceite, la disposición de estas moléculas es la opuesta a la observada para las micelas directas. Las cabezas polares están orientadas hacia el interior del agregado mientras que las cadenas alifáticas lo están hacia el exterior (Esquema 1.11. Imagen B).

-Micelas cilíndricas: Para algunas moléculas anfifílicas, cuando se aumenta su concentración, por encima de la CMC, los agregados micelares crecen de forma asimétrica, es decir, se pasa de tener micelas esféricas a elipsoidales o cilíndricas. En ellas las repulsiones entre las cabeza cargadas son menores, lo que permite un menor radio de curvatura para los agregados³⁵ (Esquema 1.11. Imagen C).

Cloruros



Esquema 1.11. Tipos de agregados que pueden adquirir los tensioactivos: A) micelas directas; B) micelas inversas; C) micelas cilíndricas y D) vesículas o liposomas.

-Liposomas o vesículas: Estas estructuras están formadas por una bicapa lipídica, donde las cabezas polares se orientan hacia la parte externa de la membrana, quedando las cadenas hidrofóbicas en el interior. Estas estructuras

son típicas de algunos fosfolípidos y de algunos tensioactivos con doble cadena. Las vesículas son estructuralmente iguales a los liposomas (Esquema 1.11. Imagen D). Las vesículas y los liposomas se diferencian en:

A) El término liposomas se usa para aquellos agregados que están formados por tensioactivos de naturaleza sintética, mientras que las vesículas son aquellos agregados que se forman a partir de moléculas anfifílicas de origen natural.

B) Las vesículas se ubican en entornos naturales mientras que los liposomas se encuentran en entornos artificiales.

Pese a estas diferencias, en realidad, se usan de forma indistinta ambos términos. Por ello, en este trabajo se va a usar el término liposoma.

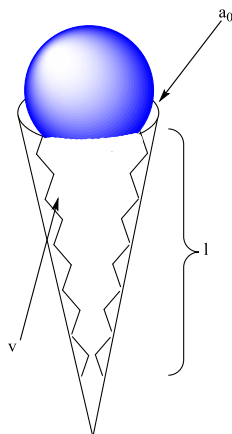
1.6 Liposomas

Si bien la formación de estos agregados, como ya se ha comentado anteriormente, se ve favorecida por la disminución del contacto entre las cadenas hidrófobas y el agua, es de destacar la existencia de interacciones que se oponen a la formación de estos sistemas. Entre ellas:

- Las interacciones electrostáticas de naturaleza repulsiva entre los grupos polares de las moléculas vecinas.
- Las limitaciones estéricas por el volumen que ocupan los grupos de cabeza de las moléculas anfifílicas.

La forma de las distintas estructuras cuando una molécula anfifílica se auto-asocia en disolución puede predecirse mediante el valor del parámetro de empaquetamiento³⁶, P , definido por Israelachvili³⁷ en función de las características geométricas de la molécula anfifílica.

$$PF = \frac{v}{a_0 \cdot l} \quad 1.1$$



Donde “v” es el volumen de las cadenas hidrocarbonadas, asumiendo que son fluidas e incompresibles, “l” es la longitud crítica de la cadena hidrocarbonada, es decir, la longitud máxima efectiva que pueden alcanzar las cadenas cuando forman parte del agregado coloidal, y “a₀” es el área efectiva de la cabeza polar en la superficie del agregado (imagen de la izquierda). El factor de empaquetamiento (PF) se define como el cociente entre el volumen de las cadenas y el producto del área y la longitud ecuación 1.1.

Los valores de v y l se pueden determinar, en el caso de cadenas hidrocarbonadas lineales, usando las ecuaciones 1.2 y 1.3 desarrolladas por Tanford³⁸. Para ello sólo tenemos que conocer el número de átomos de carbono (nc) que forma parte de la cadena alifática de dicha molécula anfifílica.

$$v = 27.4 + 26.9nc \quad \text{\AA}^3 \quad 1.2$$

$$l = 1.5 + 1.265nc \quad \text{\AA} \quad 1.3$$

Según los valores que se obtengan se puede anticipar el tipo de estructura o agregado que se podría formar con distintas moléculas anfifílicas.

Micelas cilíndricas: $\frac{1}{3} < \frac{v}{a_0 \cdot l} \leq \frac{1}{2}$

Bicapa lipídica: $\frac{1}{2} < \frac{v}{a_0 \cdot l}$

Si el valor de PF se encuentra entre 0,5 y 1 se puede predecir que el agregado que se formará es un liposoma, mientras que si el valor de PF es la

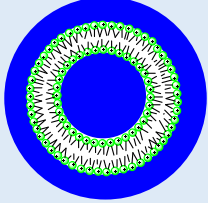
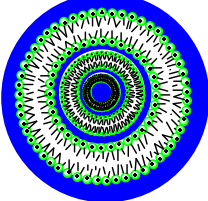
unidad, la estructura obtenida es una bicapa plana. Si se supera este valor, la estructura será de tipo hexagonal inversa.

1.6.1 Clasificación de liposomas.

Para que un liposoma se forme es necesario que se alcance una concentración de moléculas anfifílicas mínima, conocida como concentración vesicular crítica, CVC. Los liposomas formados se pueden caracterizar en función de sus propiedades fisicoquímicas como son el tamaño y la lamelaridad liposomal.

En el caso de ser una sola bicapa o lamela la que separa el interior, del disolvente externo, las estructuras se clasifican en función de su tamaño como liposomas unilamelares pequeños (SUV), cuyo tamaño se encuentra entre 40 y 100 nm, grandes (LUV), cuyo tamaño puede llegar a los 500 nm y gigantes (GUV), con un tamaño mayor a 1 μm . También se ha encontrado que varios liposomas unilamelares forman parte de un liposoma mayor, a este tipo se denomina liposoma multivesicular (MVV) con tamaño mayor a 1 μm ^{39,40} (ver tabla 1.2).

Tabla 1.2. Clasificación de los liposomas según su tamaño y número de bicapas.

Nombre	Nº de lamelas	Tamaño/nm	Esquema
SUV	Unilamelares	20-100	
LUV	Unilamelares	Hasta de 500	
GUV	Unilamelares	1000 <	
MLV	Multilamelares	500 <	
OLV	Multilamelares	100-1000	

También existen liposomas con varias bicapas que atrapan en su interior parte del disolvente, se les conoce como multilamelares (MLV) y su tamaño será mayor a 500 nm. Los liposomas multilamelares cuyo tamaño está en el rango de 100 nm hasta 1 μm se denominan oligomelares⁴¹ (OLV).

Otra clasificación se basa en la carga de la interfase, así podemos tener liposomas catiónicos^{42,43}, liposomas aniónicos⁴⁴, liposomas neutros⁴⁵ y los formados por moléculas lipídicas que contienen macrociclos como grupo de cabeza^{46,47}.

1.6.2 Síntesis:

Los liposomas SUV son muy interesante por sus aplicaciones médicas, uno de los métodos de síntesis más utilizados es el denominado **dispersión simple**, el cual consiste en una serie de pasos⁴⁸:

1- Preparación de la membrana o bicapa. Se parte de las disoluciones en disolventes orgánicos, como son el cloroformo o el ciclohexano, de los lípidos que estarán presentes en el liposoma. Estas disoluciones se mezclan en las proporciones idóneas, quedando así definida la composición de la bicapa. El disolvente orgánico se evapora mediante el uso de una bomba de vacío o una centrifugadora evaporadora, obteniéndose así una fina película formada por la bicapa lipídica que se adhiere a las paredes del vial en el que se trabaja.

2- Hidratación de la bicapa lipídica y dispersión en disolventes polares como puede ser agua, o una disolución tampón. La hidratación debe hacerse por encima de la temperatura de transición del lípido, durante 30 minutos y con ayuda de agitación. De esta forma, parte de la disolución queda atrapada en la bicapa lipídica, es decir, en el liposoma. El resto del disolvente se queda en el entorno del liposoma, el cual se forma espontáneamente en contacto con la disolución acuosa. Los liposomas obtenidos de esta forma son fundamentalmente SUV, pero con una polidispersidad elevada. Para controlar el tamaño de los liposomas hay que utilizar la técnica de la extrusión, proceso mediante el cual se consigue reducir la polidispersidad de los tamaños.

3- Extrusión de los agregados. Los liposomas unilamelares y multilamelares obtenidos se hacen pasar por un filtro de policarbonato de un tamaño de poro definido. Tras este proceso se obtienen liposomas unilamelares monodispersos, con una distribución de tamaño pequeña.

Además del método de dispersión simple, existen otros métodos para obtener este tipo de liposomas:

Inyección de etanol o éter: Los lípidos de partida se disuelven en etanol o éter. Esta disolución se inyecta rápidamente en una disolución tampón con

la que se desea trabajar obteniéndose la formación espontánea de liposomas, principalmente de tipo SUV, aunque también se forman algunos de tipo MLV. Posteriormente se lleva a cabo una ultrafiltración para eliminar los posibles restos de etanol o éter según sea el caso.

Síntesis de liposomas tipo MLV. Se utiliza un protocolo que incluye varios ciclos de evaporación del disolvente y sonicación. Se inicia con el proceso de evaporación del cloroformo en el que se encuentran los lípidos y, una vez se tiene la bicapa de lípidos, se añade ciclohexano con una pequeña cantidad de etanol (1-2% del volumen total) para aumentar la miscibilidad. Se liofiliza la muestra con ayuda de un sistema de vacío durante al menos 5 horas. Una vez que se tiene la membrana, se procede a la hidratación de dicha bicapa lipídica, para ello se agita energéticamente mediante sonicador, manteniendo siempre la temperatura por encima de la correspondiente a la de transición de fase de los lípidos, agitando enérgicamente mediante un sonicador. Este proceso permite obtener vesículas multilamelares, pero el tamaño y la lamelaridad son difíciles de controlar⁴⁹.

Síntesis de liposomas tipo LUV. El método utilizado se denomina evaporación en fase reversa, y utiliza un volumen muy pequeño de fase acuosa en la solución orgánica en la que están inmersos los fosfolípidos. Tras la adición de la fase acuosa por encima de la temperatura de transición del lípido, la mezcla se sonica dando lugar a una emulsión. La fase orgánica se elimina a presión reducida dando lugar a liposomas en una fase de gel intermedio. Finalmente, tras una fuerte agitación, se obtiene una disolución concentrada de liposoma muy polidispersa desde pocos nanómetros hasta casi 10 μm según la composición y concentración de los lípidos, la temperatura, fuerza de sonicación y tiempo. Un problema asociado a este método es que las condiciones de trabajo son difícilmente reproducibles⁵⁰.

Tras la hidratación de la bicapa lipídica se forman de manera espontánea liposomas multilamelares de diferentes tamaños. Según el tipo de energía mecánica aplicada (vórtex o sonicación), se obtienen liposomas unilamelares pequeños o grandes.

En todos los casos, una vez obtenidos los liposomas, se deben almacenar a una temperatura de 4°C a pH 7. En general su estabilidad en disolución es de una semana.

1.7 Empleo de monómeros y agregados de moléculas anfifílicas como vectores de ADN.

Esta tesis se centrará en el empleo de tensioactivos catiónicos y agregados de estos como vectores. El empleo de estas moléculas como vectores es interesante por sus interacciones con el ADN y los cambios morfológicos en el polinucleótido que resultan de las mismas. Así:

- a) Reducción del tamaño de las moléculas de polinucleótido.
- b) Reducción de la carga negativa del ADN.

Estos cambios en las propiedades de las moléculas de ácidos nucleicos contribuyen de una forma positiva al transporte a través de la membrana celular. Además, si los tensioactivos catiónicos son biocompatibles, se conseguirá el objetivo de la transfección sin afectar al funcionamiento de la célula.

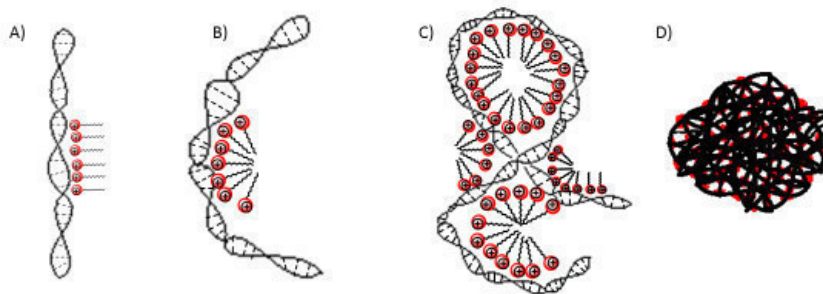
1.7.1 Interacción de ADN con monómeros de tensioactivos.

Sobre la interacción de monómeros de tensioactivos catiónicos con el ADN se han encontrado en la bibliografía dos teorías:

- 1) Los monómeros forman agregados premicelares en disolución, estos se disponen cerca de la superficie del polinucleotido. La concentración de tensioactivo catiónico a la que aparecen estos se denomina concentración de agregación crítica (CAC)^{51,52}.
- 2) Los monómeros de tensioactivo catiónico se disponen sobre la superficie del polinucleotido. Cuando se supera una concentración de estas con el ADN aparecen agregados premicelares o moléculas interaccionado hemimicelas en la superficie del polinucleotido, esta concentración de tensioactivo es la CAC^{53,54}.

El autor de esta memoria adopta la idea de que los monómeros de tensioactivos interaccionen con el ADN (teoría 2)) y por ello se centra en describir un posible mecanismo mediante el cual la formación del complejo tensioactivo/ADN concluye con la compactación del polinucleotido.

En la asociación entre tensioactivos catiónicos y polinucleotido contribuyen dos tipos de fuerzas principalmente: electrostáticas, entre las cabezas cargadas de los tensioactivos catiónicos y la carga negativa de los grupos fosfatos del ADN, e hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas de las moléculas de tensioactivo. En la naturaleza los tensioactivos suelen ubicarse en una región del polinucleotido. El Esquema 1.12 muestra las distintas situaciones en función de la concentración de tensioactivo.



Esquema 1.12. Interacción de los monómeros de tensioactivo con el ADN. A) Baja concentración de tensioactivo; B) Aparición de los primeros agregados premicelares o hemimicelas; C) Aumento de la presencia de estos agregados y primeras variaciones apreciables en el tamaño del polinucleotido; D) Estructura de ovillo del ADN compactado.

Como ya se ha comentado anteriormente las moléculas de tensioactivo tiende a auto-agregarse. Algo parecido es lo que acontece cuando estas moléculas de tensioactivo se encuentran en la superficie del ADN, ya que como se puede ver en el Esquema 1.12 A), la parte hidrofóbica se orienta hacia la disolución, lo que no sería termodinámicamente favorable. Es por esto por lo que las cadenas tienden a acercarse, ya que de esta forma se reducen la superficie de contacto con el agua y esto conlleva una estabilidad del sistema (ver Esquema 1.12 B)).

Los sistemas tensioactivo/ADN tienen un punto de inflexión muy importante, que es cuando hay suficientes moléculas de tensioactivo catiónico en la superficie del polinucleotido para favorecer termodinámicamente la formación de hemimicelas. Esta concentración de tensioactivo se denomina CAC. La formación de hemimicelas está promovida por las mismas interacciones que contribuyen a la formación de las micelas, pero las CAC son concentraciones más bajas que las CMC^{53} . Esto se debe a que el polinucleotido hace las funciones de un centro de nucleación y a que el tamaño de las hemimicelas es menor. La formación de estos agregados premicelares en la

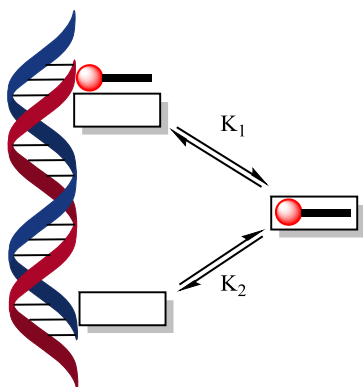
superficie del ADN lleva asociado un cambio estructural del polinucleotido como se puede ver en Esquema 1.12 C).

Como ya se ha comentado la estructura que muestra el ADN en disolución es una doble hélice alargada. Esta estructura se ve modificada por la formación de los agregados premicelares o hemimicelas en la superficie del polinucleotido. Así se puede apreciar un cambio conformacional desde una estructura de doble cadena alargada a una conformación más compactada⁵⁵ (forma de ovillo) Esquema 1.12 D).

La formación del complejo tensioactivo catiónico/ADN con una conformación de ovillo, presenta una carga global positiva, reduciendo las repulsiones entre este complejo y la membrana celular.

Como se ha comentado, una de las fuerzas impulsoras de la autoagregación es la interacción entre las cadenas de tensioactivos vecinas. Por lo tanto, la formación de estos agregados se produce porque los monómeros de tensioactivo se encuentran en una misma región del polinucleótido. Cuando una molécula de tensioactivo se une al ADN, ésta se podría localizar en la cercanía de otra que ya se encuentra enlazada al polinucleótido, o se puede unir en una zona del ADN donde no se encuentre ninguna otra molécula de tensioactivo interaccionando. La zona del polinucleótido en la que se localice la segunda molécula de tensioactivo viene condicionada por la constante de interacción de esta molécula con el sitio de unión. En la naturaleza se observan tres casos distintos:

- Sistema cooperativo: Para este tipo de sistemas es más favorable la interacción con el polinucleotido en la región donde se encuentra previamente otra molécula interaccionando, que en aquella donde no se encuentra ninguna. En el esquema $K_1 > K_2$.



- Sistema anti-cooperativo: En este caso es más favorable la interacción de una molécula en la zona en la que no hay otra presente. En el esquema $K_1 < K_2$.

- Sistema no cooperativo: En estos sistemas las constantes de interacción no se ven afectadas por la presencia o no de otra molécula unida al polinucleótido. En este

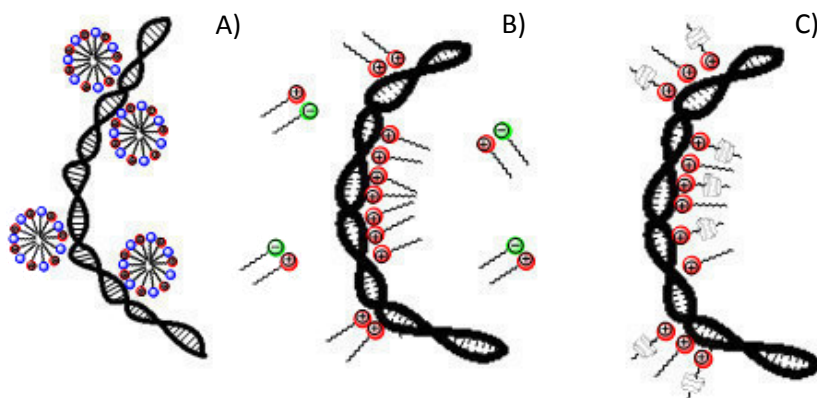
caso las dos constantes son similares.

En el caso de los sistemas tensioactivos/ADN, la interacción es de tipo cooperativo.

El proceso que se ha descrito como compactación del ADN es un mecanismo reversible, una vez que el polinucleótido se ha compactado (forma de ovillo) como resultado de las interacciones con otras moléculas, se puede provocar su decompactación del ADN, que vuelve a su conformación inicial. Una forma de producir el proceso de decompactación del complejo tensioactivo/ADN consiste en adicionar moléculas que tengan una mayor afinidad por el tensioactivo que la mostrada por el ADN. Esto provoca una disminución de las moléculas de tensioactivo unidas al polinucleótido, y por ello, una desaparición de los agregados premicelares o hemimicelas que son los principales responsables de la compactación del ADN. Como es de esperar, esta disminución de agregados premicelares en la superficie del polinucleótido nos conduce a un desempaquetamiento de éste. Esta función la pueden desempeñar moléculas como las ciclodextrinas, tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, contraiones con alta afinidad por los tensioactivos o altas concentraciones del mismo tensioactivo catiónico responsable de la compactación^{54,56-59}.

El estudio de estos mecanismos es muy importante ya que una vez el polinucleótido, ayudado por el vector, se halla en el interior de la célula, es imprescindible que se produzca una decompactación para que la información genética pueda ser asimilada por el receptor. A continuación, se van a considerar las especies que más frecuentemente se utilizan para la decompactación para los sistemas tensioactivo catiónicos/ADN:

- Tensioactivos neutros: Las moléculas de tensioactivo neutro se intercambian por las de tensioactivo catiónico que forman los agregados premicelares. Hay que tener en cuenta que forman hemimicelas más estables debido a la menor repulsión entre las cabezas polares (ver Esquema 1.13 A). Dado que estas hemimicelas no tienen carga, el polinucleotido recupera su conformación inicial⁵⁷.

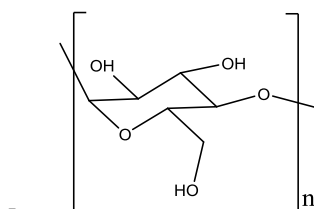


Esquema 1.13. Diferentes métodos para la decompactación del ADN empleando diferente tipos de moléculas. A) Método que emplea tensioactivos neutros. B) Método que emplea tensioactivos aniónicos. C) Método que emplean moléculas macrocíclicas como las ciclodextrinas.

- Tensioactivos aniónicos: Las moléculas de tensioactivo aniónico interaccionan con las moléculas de tensioactivo catiónico (ver Esquema 1.13 B) mediante interacciones electrostáticas, entre las cabezas cargadas de los tensioactivos, e interacciones hidrofóbicas, entre las

cadenas de los dos tensioactivos. El resultado es la formación de micelas mixtas en disolución, que prevalece sobre la formación de hemimicelas en el ADN. Esto conlleva la decompactación del ADN desde la forma de ovillo a la forma alargada (random coil)⁵⁶.

- Ciclodextrinas: Las ciclodextrinas se componen de 6 o más unidades de α -D-glucopiranososa (glucosa cíclica). Normalmente las ciclodextrinas contienen un número de monómeros de glucosa que van de seis a ocho unidades en un anillo. Reciben distintos nombres α , β y γ -ciclodextrina que corresponde a seis, siete y ocho unidades de glucopiranososa respectivamente (con una cavidad interna cuyo tamaño varía entre 5 y 8 Å)⁶⁰. Se pueden representar como un cono truncado, con la abertura más grande expuesta a los grupos hidroxilo secundarios, y la pequeña a los grupos hidroxilo primarios. Debido a esta disposición, el interior de las moléculas tiene carácter hidrofóbico, lo que permite que se formen complejos de inclusión con otras moléculas hidrofóbicas. Por otro lado, el exterior es suficientemente hidrofílico para permitir que las ciclodextrinas sean solubles en agua⁶¹.

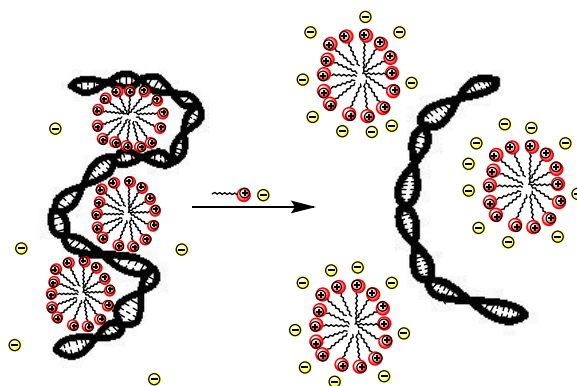


Esquema 1.14. Estructura de la ciclodextrina donde n puede ser igual a 6, 7 o 8.

Estos macrociclos interaccionan con las moléculas de tensioactivo de forma que la cadena hidrocarbonada de estos se localiza en la cavidad de la ciclodextrina (ver Esquema 1.13 C), formando complejos de inclusión muy estables. Por ello, cuando se añaden ciclodextrinas a un sistema tensioactivo-ADN, las interacciones tensioactivo/ADN el primero interaccionará

preferentemente con las ciclodextrinas, desapareciendo las hemimicelas sobre el polinucleótido, lo que resulta en la decompactación de este^{56,58,59}.

- Contraiones de los tensioactivos: Los contraiones de carga elevada interaccionan con los agregados premicelares formados sobre el ADN, de tal forma que apantallan la afinidad que estos tienen hacia el polinucleótido (ver Esquema 1.15). Esto resulta en la decompactación del polinucleótido⁵².

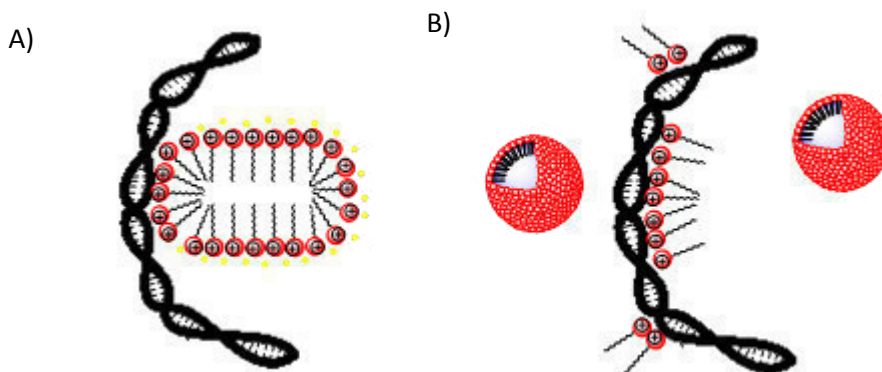


Esquema 1.15. Decompactación del polinucleótido por la interacción de los contraiones con los tensioactivos.

- Uso de altas concentraciones del mismo tensioactivo catiónico: La decompactación empleando este método se puede deber a dos efectos:

A) Al aumentar la concentración de tensioactivo se puede producir un cambio conformacional de estos agregados requiriendo una mayor cantidad de contra-ion para estabilizar la estructura (ver Esquema 1.16 A). Esta estructura es incompatible con la compactación del polinucleótido.

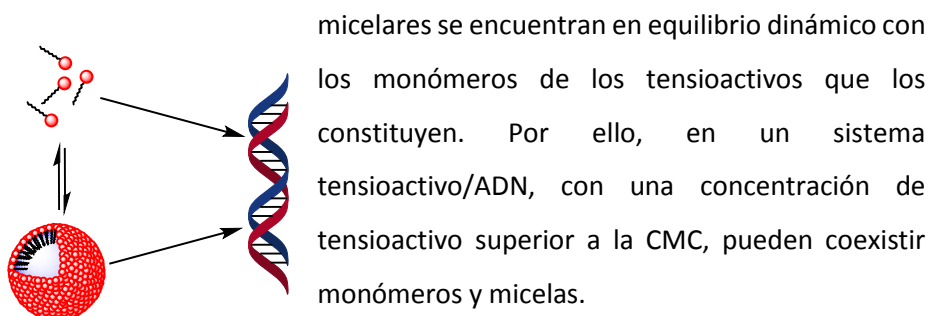
B) La formación de micelas en la disolución (no en la superficie del polinucleótido) es termodinámicamente más favorable que la formación de los agregados premicelares en la superficie del ADN (ver Esquema 1.16 B)⁵⁴.



Esquema 1.16. Decompactación del ADN mediante el uso de concentraciones altas de tensioactivos catiónicos, esto se puede deber a dos efectos: A) Cambio estructural de los agregados formados en la superficie del polinucleótido. B) Que sea más favorable la formación de las micelas que las correspondientes hemimicelas en la superficie del ADN.

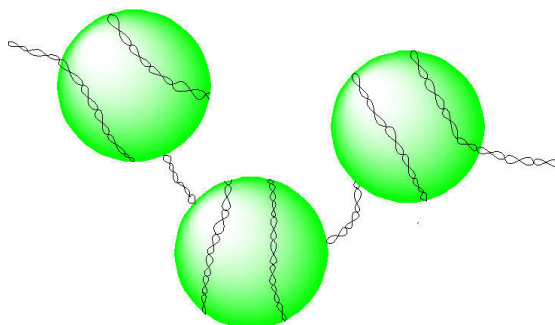
1.7.2 Interacción del ADN con micelas

La estructura de los agregados formados por moléculas de tensioactivo se describió anteriormente. Es importante recordar que los agregados



La interacción de los monómeros de tensioactivo con el polinucleótido se encuentra descrita anteriormente. En el caso de las micelas, las moléculas de ADN se pueden disponer en la superficie cargada de estos agregados, debido a la atracción electrostática que se pone en juego entre la carga negativa del polinucleótido y la carga positiva de los agregados micelares (ver

Esquema 1.17). La obtención de información de la interacción de las micelas con ADN es difícil debido a la existencia del equilibrio anteriormente mencionado. Una posible solución es el empleo de micelas poliméricas. Estas micelas son más estables y podríamos realizar el estudio de su interacción con el ADN.



Esquema 1.17. Interacción de una hebra de ADN con los agregados micelares. Éstos agregados son de tensioactivo catiónico.

1.7.3 Interacción de ADN con liposomas, formación del lipoplejo.

Antes de abordar en la interacción de los liposomas con el ADN, habría que realizar una introducción a la teoría DLVO que nos aporta información sobre la estabilidad coloidal. Esta fue la primera teoría que se desarrolló para describir cuantitativamente la estabilidad de las suspensiones coloidales. Debe su nombre a Derjaguin y Landau⁶², Verwey y Overbeek⁶³ y establece que la interacción entre dos partículas coloidales se explica mediante un balance de las fuerzas de dispersión atractivas (fuerzas de London, de Van der Waals...) y las de repulsión electrostática. Estas dos fuerzas se pueden evaluar por separado, gracias a que su origen es independiente. Dependiendo de la magnitud relativa de estas dos interacciones, el valor neto de la interacción

puede ser atractivo o repulsivo. En esta teoría se supone que las partículas que interaccionan son tan grandes, comparadas con los iones del polielectrolito de su alrededor, que permanecen inmóviles en la disolución. Lo que permite expresar la interacción entre las partículas en función de la distancia. La teoría DLVO también considera que las partículas tienen una distribución de carga superficial uniforme, por lo que no se puede explicar en aquellos casos en los que la distribución de carga sea irregular.

De forma general, la adición de polielectrolitos cargados sobre una disolución de partículas cargadas provoca dos fenómenos: inversión de carga de la partícula⁶⁴⁻⁶⁶ y condensación del polielectrolito^{65,66}. El primero ocurre cuando iones de carga elevada (poli-ion), y signo contrario, se depositan sobre la superficie de la partícula, invirtiendo el signo de su carga efectiva. El segundo efecto consiste en la formación de agregados sobre la partícula y en la disolución. El tamaño de los agregados aumenta con la concentración del poli-iones hasta alcanzar un valor máximo (que es el punto de inversión de carga), a partir del cual decrece hasta volver a su valor inicial (o un poco mayor debido al espesor del polielectrolito depositado sobre la partícula).

La formación de estos agregados es independiente del sistema polímero/partícula elegido, ya que ha sido observado en liposomas catiónicos interaccionando con polielectrolitos aniónicos y en partículas de poliestireno cargadas interaccionando con polielectrolitos naturales de carga opuesta⁶⁷⁻⁶⁹.

En la presente memoria se utilizarán liposomas catiónicos mixtos, liposomas compuestos por más de un lípido. El empleo de los liposomas como vectores fue descrito por primera vez a finales de los años 80 por Felgner⁷⁰. Éste definía los lipoplejos como pequeños liposomas que interaccionaban de forma espontánea con el ADN para formar complejos ADN/liposoma.

La información de que se dispone en la literatura sobre el fenómeno de compactación lipídica del ADN, pone de manifiesto que la formación de los lipoplejos constituye un fenómeno de origen tanto termodinámico como cinético que da lugar a una gran distribución de formas y tamaños. Se trata de una interacción esencialmente electrostática pero entrópicamente dirigida, es decir, el incremento entrópico originado por la liberación de contraiones por ambas especies es la fuerza conductora de la asociación ADN/liposoma. Hay que tener en cuenta que parte de la carga negativa (grupos fosfato) del ADN se encuentra neutralizada por contraiones. Cuando se añaden liposomas catiónicos, sus grupos cargados positivamente tienden a neutralizar la carga del ADN, reemplazando a los contraiones de este. Paralelamente, los contraiones de los liposomas catiónicos también pasarán a la disolución. El resultado es un agregado de dimensiones semejantes a las nanopartículas cuya estabilidad y cinética de agregación dependerán, entre otros parámetros, de la composición del liposoma, composición del lipoplejo, carga neta del mismo, fuerza iónica del medio, etc.

Para que el lipoplejo se pueda formar es necesario que el sistema experimente un proceso de inversión de carga⁶⁹. Este fenómeno, también conocido como efecto de sobrecarga, consiste en la capacidad de un coloide cargado de atraer contraiones hasta el punto de que la carga neta del sistema sea de signo contrario a la que el coloide poseía originalmente (previsto por la teoría de DLVO).

Por consiguiente, es crucial analizar y comprender el balance de cargas y la interacción electrostática que dan origen a la formación del lipoplejo. La caracterización electroquímica de los lipoplejos constituye, de hecho, el punto de arranque sobre el que se asienta su estudio, no sólo de tipo biofísico, sino también bioquímico. Como se ha mencionado anteriormente, en la formación del lipoplejo se produce un balance entre las cargas positivas del liposoma

catiónico y las negativas del ADN, y por ello, las propiedades electroquímicas, como la movilidad electroforética y las propiedades que de ella derivan, se ven modificadas.

Se sabe que la composición tanto del liposoma catiónico como del lipoplejo son factores que tienen una gran influencia en su comportamiento, características y estructura, y, por consiguiente, son determinantes en sus prestaciones finales como vectores génicos. La composición del liposoma se expresa normalmente en términos de su fracción molar, α ($\frac{\text{moles de lípido con carga}}{\text{moles de lípidos totales}}$), mientras que para la composición del lipoplejo se suelen utilizar en la bibliografía dos parámetros adimensionales, la relación de masas entre lípidos y ADN $\left(\frac{L}{D}\right)$ o su relación de cargas efectivas, Z_{eff} , que nos informa del cociente entre las cargas positivas efectivas aportadas por el vector lipídico catiónico y las cargas negativas efectivas aportadas por los grupos fosfato del ADN. En estos sistemas existe un valor de α para el cual el valore de Z_{eff} es igual a 1. En esta relación las cargas positivas y negativas del sistema se encuentran igualadas, este valor se conoce como relación de electroneutralidad y es característico de cada sistema.

1.8 Objetivos.

El objetivo principal de esta tesis es la obtención de nuevos sistemas que sirvan como vectores para el ADN. En ellos los lípidos catiónicos son moléculas de metalosurfactantes, en concreto tensioactivos derivados del complejo metálico $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Se verá que incluso sin la formación de liposomas mixtos con lípidos neutros, estos lípidos catiónicos son capaces de compactar el ADN e introducirlo en las células. Además, también se pueden utilizar como nanotransportadores de fármacos como la doxorrubicina, un agente antineoplásico. Por último, indicar que estos metalosurfactantes presentan, en sí mismos, actividad antineoplásica.

1.9 Bibliografía.

- (1) Xiang, X.; Shi, J.; Huang, F.; Zheng, M.; Deng, Q.; Xu, J. MoS₂ Nanosheet-Based Fluorescent Biosensor for Protein Detection via Terminal Protection of Small-Molecule-Linked DNA and Exonuclease III-Aided DNA Recycling Amplification. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 227–232.
- (2) ISO/TC 229- Nanotechnologies. *Int. Organ. Stand.*
- (3) Gennaro, A. R. *Remington Farmacia*, 20^o.; medica panamericana, 2003.
- (4) Li, J.; Ni, X.; Leong, K. W. Injectable Drug-Delivery Systems Based on Supramolecular Hydrogels Formed by Poly(Ethylene Oxide)s and Alpha-Cyclodextrin. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *65* (2), 196–202.
- (5) Chiappetta, D. A.; Sosnik, A. Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide) Block Copolymer Micelles as Drug Delivery Agents: Improved Hydrosolubility, Stability and Bioavailability of Drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66* (3), 303–317.
- (6) Abdelkader, H.; Alani, A. W. G.; Alany, R. G. Recent Advances in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Self-Assembly, Fabrication, Characterization, Drug Delivery Applications and Limitations. *Drug Deliv.* **2014**, *21* (2), 87–100.
- (7) Davis, M. E.; Brewster, M. E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (12), 1023–1035.
- (8) Zhang, L.; Lu, J.; Jin, Y.; Qiu, L. Folate-Conjugated Beta-Cyclodextrin-Based Polymeric Micelles with Enhanced Doxorubicin Antitumor Efficacy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *122*, 260–269.
- (9) Hattori, Y.; Nakamura, M.; Takeuchi, N.; Tamaki, K.; Shimizu, S.; Yoshiike, Y.; Taguchi, M.; Ohno, H.; Ozaki, K.; Onishi, H. Effect of Cationic Lipid in Cationic Liposomes on siRNA Delivery into the Lung by Intravenous Injection of Cationic Lipoplex. *J. Drug Target.* **2018**.
- (10) Merten, O. W.; Gaillet, B. Viral Vectors for Gene Therapy and Gene Modification Approaches. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *108*, 98–115.
- (11) Richardson, S. R.; Doucet, A. J.; Kopera, H. C.; Moldovan, J. B.; Garcia-Perez, J. L.; Moran, J. V. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3* (2), 1–26.
- (12) Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; Naldini, L. Viral Vectors for Gene Therapy: The Art of Turning Infectious Agents into Vehicles of Therapeutics. *Nat. Med.* **2001**, *7* (1), 33–40.
- (13) Somia, N.; Verma, I. M. Gene Therapy: Trials and Tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1* (November), 91–99.
- (14) D. D. Lasic. *Liposomes in Gene Delivery*; Paul Petralia, Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- (15) Ogris, M.; Steinlein, P.; Kurs, M.; Mechtler, K.; Kircheis, R.; Wagner, E. The Size of DNA/Transferrin-PEI Complexes Is an Important Factor for Gene Expression in Cultured Cells. *Gene Ther.* **1998**, *5* (10), 1425–1433.

- (16) Al-Dosari, M. S.; Gao, X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J.* **2009**, *11* (4), 671–681.
- (17) Pombo, M. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*, 4º.; Pombo, M., Ed.; Mcgraw-Hill Interamericana: Madrid, 2010.
- (18) Boado, R. J.; Pardridge, W. M. Complete Protection of Antisense Oligonucleotides Against Serum Nuclease Degradation by an Avidin-Biotin System. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (6), 519–523.
- (19) Alberto Juan Solari. *Genética Humana: Fundamentos y Aplicaciones En Medicina*, 3ª.; panamericana: Buenos Aires, 2004.
- (20) Leslie, A. G. W.; Arnott, S.; Chandrasekaran, R.; Ratliff, R. L. Polymorphism of DNA Double Helices. *J. Mol. Biol.* **1980**, *143* (1), 49–72.
- (21) Passarge, E. *GENETICA Texto y Atlas.*, 3rd ed.; panamericana: New York, 2007.
- (22) DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. *PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA*, 4ª.; OMEGA, 2005.
- (23) Alfonso, J. S.; Ricardo Guerrero. *Genética Molecular Bacteriana*; EDITORIAL REVERTE S.A., Ed.; Barcelona.
- (24) PIERCE, B. A. *GENETICA: UN ENFOQUE CONCEPTUAL*, 3ª.; PANAMERICANA, Ed.; 2009.
- (25) Peña, A. A. A.; Gomez, A. R. T. *Bioquímica*; LIMUSA, NORIEGA EDITORES: mexico, 2004.
- (26) Griffiths, P. C.; Fallis, I. A.; James, C.; Morgan, I. R.; Brett, G. L.; Heenan, R. K.; Schweins, R.; Grillo, I.; Paul, A. Structure-Property Relationships in Metallosurfactants. *Soft Matter* **2010**, *6* (9), 1835–2094.
- (27) Domínguez-Gutiérrez, D.; Surtchev, M.; Eiser, E.; Elsevier, C. J. Ru(II)-Based Metallosurfactant Forming Inverted Aggregates. *Nano Lett.* **2006**, *6* (2), 145–147.
- (28) Garcia, P.; Eaton, P.; Geurts, H. P. M.; Sousa, M.; Gameiro, P.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; Pereira, E.; De Castro, B. AFM and Electron Microscopy Study of the Unusual Aggregation Behavior of Metallosurfactants Based on Iron(II) Complexes with Bipyridine Ligands. *Langmuir* **2007**, *23* (15), 7951–7957.
- (29) Owen, T.; Butler, A. Metallosurfactants of Bioinorganic Interest: Coordination-Induced Self Assembly. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (7–8), 678–687.
- (30) Santhakumar, K.; Kumaraguru, N.; Arunachalam, S.; Arumugham, M. N. Thermodynamics and Micellar Properties of Some Surface Active Cobalt(III) Metallosurfactants in Nonaqueous Medium. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, *39* (1), 22–31.
- (31) Kumaraguru, N.; Santhakumar, K. Synthesis, Characterization, Critical Micelle Concentration Determination, and Antimicrobial Studies of Some Complexes of Chromium(III) Metallosurfactants. *J. Coord. Chem.* **2009**, *62* (21), 3500–3511.
- (32) Kaur, G.; Kumar, S.; Dilbaghi, N.; Kaur, B.; Kant, R.; Guru, S. K.; Bhushan, S.; Jaglan, S. Evaluation of Bis(hexadecyltrimethyl Ammonium Palladium Tetrachloride Based Dual Functional Colloidal Carrier as an Antimicrobial and Anticancer Agent. *Dalt. Trans.* **2016**, *45*, 6582–6591.
- (33) Parera, E.; Comelles, F.; Barnadas, R.; Suades, J. Formation of Vesicles with an Organometallic Amphiphile Bilayer by Supramolecular Arrangement of Metal Carbonyl

- Metallosurfactants. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (15), 4460.
- (34) Bowers, J.; Amos, K. E.; Bruce, D. W.; Webster, J. R. P. Surface and Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of Ru(II) Metallosurfactants. 3. Effect of Chain Number and Orientation on the Structure of Adsorbed Films of [Ru(Bipy)₂(Bipy')]₂Cl₂ Complexes. *Langmuir* **2005**, 21 (4), 1346–1353.
 - (35) Jensen, G. V.; Lund, R.; Narayanan, T.; Pedersen, J. S. Transformation from Globular to Cylindrical Mixed Micelles through Molecular Exchange That Induces Micelle Fusion. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, 7 (11), 2039–2043.
 - (36) Coster, H. G. L. The Physics of Cell Membranes. *J. Biol. Phys.* **2003**, 29 (4), 363–399.
 - (37) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525.
 - (38) Tanford, C. Micelle Shape and Size. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76 (21), 3020–3024.
 - (39) Sharma, A.; Sharma, U. S. Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations. *Int. J. Pharm.* **1997**, 154 (2), 123–140.
 - (40) Jones, M. N. The Surface Properties of Phospholipid Liposome Systems and Their Characterisation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, 54 (C), 93–128.
 - (41) Goren, D.; Gabizon, A.; Barenholz, Y. The Influence of Physical Characteristics of Liposomes Containing Doxorubicin on Their Pharmacological Behavior. *BBA - Biomembr.* **1990**, 1029 (2), 285–294.
 - (42) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science (80-.)*. **1997**, 275 (5301), 810–814.
 - (43) Muñoz-Ubeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Llorca, O.; Quesada-Perez, M.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. Gene Vectors Based on DOEPC/DOPE Mixed Cationic Liposomes: A Physicochemical Study. *Soft Matter* **2011**, 7 (13), 5991–6004.
 - (44) Patil, S. D.; Rhodes, D. G.; Burgess, D. J. Anionic Liposomal Delivery System for DNA Transfection. *AAPS J.* **2004**, 6 (4), 1–10.
 - (45) Bruni, P.; Pisani, M.; Amici, A.; Marchini, C.; Montani, M.; Francescangeli, O. Self-Assembled Ternary Complexes of Neutral Liposomes, Deoxyribonucleic Acid, and Bivalent Metal Cations. Promising Vectors for Gene Transfer? *Appl. Phys. Lett.* **2006**, 88 (7), 1–4.
 - (46) Wang, Y. X.; Zhang, Y. M.; Wang, Y. L.; Liu, Y. Multifunctional Vehicle of Amphiphilic Calix[4]Arene Mediated by Liposome. *Chem. Mater.* **2015**, 27 (8), 2848–2854.
 - (47) Sukegawa, T.; Furuike, T.; Niikura, K.; Yamagishi, A.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. Erythrocyte-like Liposomes Prepared by Means of Amphiphilic Cyclodextrin Sulfates. *Chem. Commun.* **2002**, 0 (5), 430–431.
 - (48) Malaekheh-Nikouei, B.; Malaekheh-Nikouei, M.; Oskuee, R. K.; Ramezani, M. Preparation, Characterization, Transfection Efficiency, and Cytotoxicity of Liposomes Containing Oligoamine-Modified Cholesterols as Nanocarriers to Neuro2A Cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2009**, 5 (4), 457–462.

- (49) Malaekheh-Nikouei, B.; Jaafari, M. R.; Tabassi, S. A. S.; Samiei, A. The Enhancement of Immunosuppressive Effects of Cyclosporine A on Human T-Cells Using Fusogenic Liposomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, 67 (2), 238–244.
- (50) Bo, R.; Xia, M.; Feng, Y.; Zhu, Q.; Huang, Y.; Liu, Z.; Liu, C.; Gao, Z.; Hu, Y.; Wang, D. Optimization on Conditions of Lycium Barbarum Polysaxxharides Liposome by RSM and Its Effects on the Peritoneal Macrophages Function. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 117, 215–222.
- (51) Jadhav, V.; Maiti, S.; Dasgupta, A.; Das, P. K.; Dias, R. S.; Miguel, M. G.; Lindman, B. Effect of the Head-Group Geometry of Amino Acid-Based Cationic Surfactants on Interaction with Plasmid DNA. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (7), 1852–1859.
- (52) Xu, L.; Feng, L.; Hao, J.; Dong, S. Compaction and Decomposition of DNA Dominated by the Competition between Counterions and DNA Associating with Cationic Aggregates. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, 134, 105–112.
- (53) Zhao, X.; Shang, Y.; Hu, J.; Liu, H.; Hu, Y. Biophysical Characterization of Complexation of DNA with Oppositely Charged Gemini Surfactant 12-3-12. *Biophys. Chem.* **2008**, 138 (3), 144–149.
- (54) Grueso, E.; Cerrillos, C.; Hidalgo, J.; Lopez-Cornejo, P. Compaction and Decomposition of DNA Induced by the Cationic Surfactant CTAB. *Langmuir* **2012**, 28 (30), 10968–10979.
- (55) Yang, X.; Jian, X.; Wang, J.; Zhang, H.; Jiang, F. Interaction of a Fluorescent Cationic Surfactant Bearing a Coumarin Derivative with DNA. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 462, 170–178.
- (56) Cao, M.; Deng, M.; Wang, X. L.; Wang, Y. Decomposition of Cationic Gemini Surfactant-Induced DNA Condensates by β -Cyclodextrin or Anionic Surfactant. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112 (43), 13648–13654.
- (57) Corbyn, C. P.; Fletcher, P. D. I.; Gemici, R.; Dias, R. S.; Miguel, M. G. Re-Dissolution and de-Compaction of DNA-Cationic Surfactant Complexes Using Non-Ionic Surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11 (48), 11568–11576.
- (58) González-Pérez, A.; Ruso, J. M. A Versatile Approach towards the Compaction, Decomposition, and Immobilization of DNA Atinterfaces by Using Cyclodextrins. *ChemPhysChem* **2013**, 14 (11), 2544–2553.
- (59) Feng, L.; Xu, L.; Hao, J.; Dong, S. Controlled Compaction and Decomposition of DNA by Zwitterionic Surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, 501, 65–74.
- (60) Lindner, K.; Saenger, W. Crystal and Molecular Structure of Cyclohepta-Amylose Dodecahydrate. *Carbohydr. Res.* **1982**, 99 (2), 103–115.
- (61) French, D.; Pazur, J. H.; Norberg, E.; Levine, M. L. Studies on the Schardinger Dextrins. The Preparation and Solubility Characteristics of Alpha, Beta and Gamma Dextrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71 (1), 353–356.
- (62) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Acta Physicochim* **1941**, 43, 633.
- (63) G. Verwey; J. Oerbeek. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, 1^a.; Elsevier, Ed.; Elsevier: Amsterdam , The Netherlands, 1948; Vol. 1.

-
- (64) Bordi, F.; Cametti, C.; Sennato, S.; Viscomi, D. Polyion-Induced Liposomal Vesicle Aggregation: A Radiowave Dielectric Relaxation Study. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (2).
- (65) Bordi, F.; Cametti, C.; Diociaiuti, M.; Sennato, S. Large Equilibrium Clusters in Low-Density Aqueous Suspensions of Polyelectrolyte-Liposome Complexes: A Phenomenological Model. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2005**, *71* (5), 2–5.
- (66) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. Complexation of a Polyelectrolyte with Oppositely Charged Spherical Macroions: Giant Inversion of Charge. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114* (13), 5905–5916.
- (67) Amenitsch, H.; Caracciolo, G.; Foglia, P.; Fuscoletti, V.; Giansanti, P.; Marianecchi, C.; Pozzi, D.; Laganà, A. Existence of Hybrid Structures in Cationic Liposome/DNA Complexes Revealed by Their Interaction with Plasma Proteins. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *82* (1), 141–146.
- (68) Cametti, C. Polyion-Induced Aggregation of Oppositely Charged Liposomes and Charged Colloidal Particles: The Many Facets of Complex Formation in Low-Density Colloidal Systems. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155* (2), 63–73.
- (69) Truzzolillo, D.; Bordi, F.; Cametti, C.; Sennato, S. Phenomenological Surface Characterization of Cationic-Lipid Monolayers in the Presence of Oppositely Charged Polyions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *319* (1–3), 51–61.
- (70) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (21), 7413–7417.

Capítulo 2º.

Materiales y métodos

2.1 Los reactivos usados en la realización de esta tesis doctoral son los siguientes:

-Cloruro sódico (NaCl) para análisis, fue adquirido de la marca comercial Merck (riqueza >99.5%), (7647-14-5).

-Cacodilato de sodio, fue adquirido de la marca comercial Sigma-Aldrich (6131-99-3).

-El buffer HEPES y sus componentes (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin 1-etanosulfónico y su sal sódica) fueron adquiridos de la marca comercial Sigma-Aldrich.

-Peroxodisulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) fue adquirido de la marca comercial Fluka (riqueza >99%), (7775-27-1).

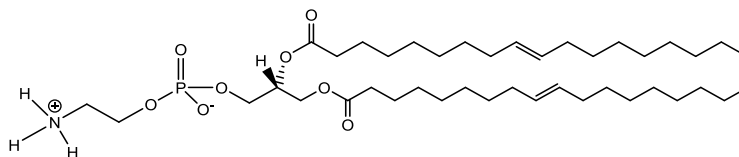
-Bromuro de etidio (BrEt), fue adquirido de la marca comercial Sigma-Aldrich (riqueza >95%), (1239-45-8).

- α -Ciclodextrina (α -CD), fue adquirida de la marca comercial Fluka (riqueza >98%), (28705).

- β -Ciclodextrina (α -CD), fue adquirida de la marca comercial Sigma-Aldrich (riqueza >98%), (101240778).

- γ -Ciclodextrina (α -CD), fue adquirida de la marca comercial Sigma-Aldrich (riqueza \geq 98%), (C4892).

-1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), fue adquirido de la marca comercial Sigma Aldrich. Este lípido pertenece a la familia de las fosfatidiletanolaminas, y presenta dos cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono cada una. A pH fisiológico (7.4), el DOPE es eléctricamente neutro.

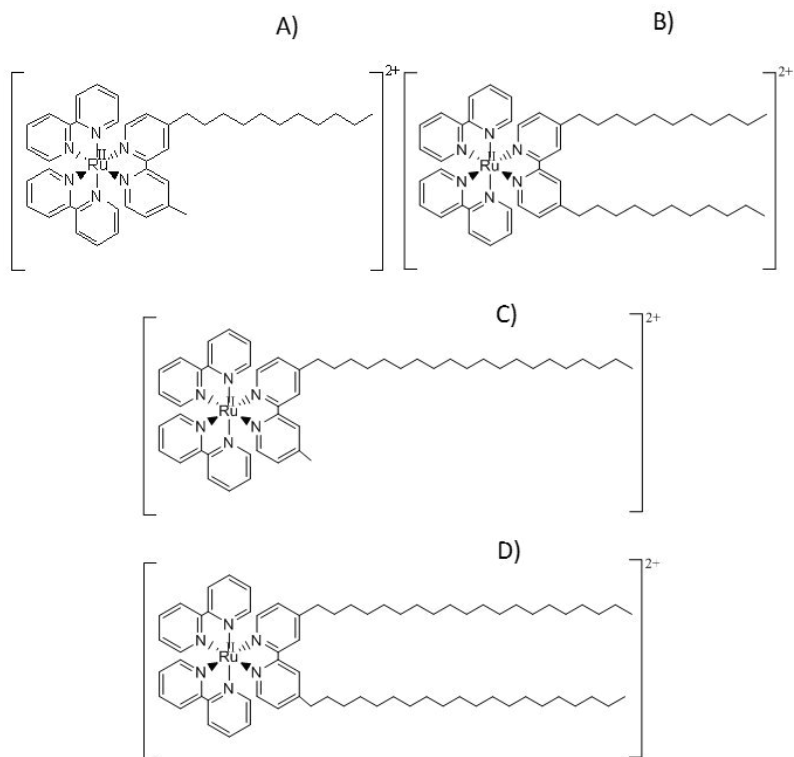


-Doxorrubicina (DOX), fue adquirida de la marca comercial Enzo Life Sciences. DOX es un medicamento de la familia de las antraciclinas, cuya estructura consiste en la unión de una antraquinona y un amino azúcar¹. Es un fármaco comúnmente usado en tratamiento del cáncer

-Tensioactivos catiónicos.

En esta Tesis se han empleados diferentes tensioactivos, todos derivados del complejo inorgánico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, cuyas fórmulas moleculares se muestran a continuación:

$[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4\text{-CH}_3\text{-4}'\text{-(C}_{11}\text{H}_{23})\text{-2,2}'\text{-bipy})]^{2+}$	RuC1C11	Esquema 2.1. A
$[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4,4'\text{-(C}_{11}\text{H}_{23})_2\text{-2,2}'\text{-bipy})]^{2+}$	RuC11C11	Esquema 2.1. B
$[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4\text{-CH}_3\text{-4}'\text{-(C}_{19}\text{H}_{39})\text{-2,2}'\text{-bipy})]^{2+}$	RuC1C19	Esquema 2.1. C
$[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4,4'\text{-(C}_{19}\text{H}_{39})_2\text{-2,2}'\text{-bipy})]^{2+}$	RuC19C19	Esquema 2.1. D



Esquema 2.1. Estructura de los metalosurfactantes derivados de Ru (II) empleados en esta tesis.

Estos tensioactivos han sido sintetizados en colaboración con el doctor D. Carlos Jesús Carrasco Carrasco, que pertenece al grupo de investigación del Profesor D. Agustín Galindo del Pozo, Catedrático de Química Inorgánica de la Universidad de Sevilla. La síntesis de estos tensioactivos se describe a continuación:

Síntesis de los ligandos C1C11 y C11C11.

La síntesis de estos dos ligandos se encuentran descritas en la bibliografía por los investigadores Sprintschnik y col.² y Tamura y col.³, por lo que no se volverán a describir aquí.

Síntesis de RuC1C11.

El producto se preparó poniendo a reflujo el complejo $[\text{Ru}(\text{2,2-bpy})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,325g, 0,62mmol) y el ligando 4-metil-4'-undecil-2,2'-bipiridina (0,200g, 0,62mmol) en 30 ml de una disolución de etanol durante 18 h a 0 °C. Después de este tiempo, el disolvente se eliminó por evaporación a vacío y se recristalizó en acetonitrilo. El compuesto $[\text{Ru}(\text{2,2'-bpy})_2(4\text{-CH}_3\text{-4'-(C}_{11}\text{H}_{23})\text{-2,2'-bpy})]\text{Cl}_2$ se obtuvo como material sólido de color naranja, obteniéndose un alto rendimiento (0,56 g, 90%). ^1H RMN en metanol deuterado, CD_3OD : δ 0.90 (t, $J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 1.28 (m br, 16H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 1.65 (q, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.85 (t, $J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 7.32 (t, $J_{\text{HH}} = 4.3$ Hz, 2H, 5- y 5'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7.47 (m, 4H, 5- y 5'-del bpy), 7.62 (m, 2H, 6- y 6'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7.83 (m, 4H, 4- y 4'-CH de bpy), 8.09 (t, $J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 4H, 6- y 6'-CH de bpy), 8.56 (d, $J_{\text{HH}} = 9.9$ Hz, 2H, 3- o 3'-CH de bpy sustituido con alquilo), 8.66 (d, $J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 4H, 3- y 3'-CH del bpy). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (CD_3OD): 16,9 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23,7 (s, CH_3), 26,3 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 33,0-35,6 (varios, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 38,8 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 128,0- 132.3 (varios s, 3- o 3'- o 5- o 5'-CH de bpy), 141.5 (s, 4- y 4'-CH de bpy), 154.1-155.2 (varios s, 4- o 4'- o 6- o 6'-CH de bpy), 159.0-161.1 (varios s, 2- o 2'-CH de bpy). Análisis elemental para $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Ru}$: calc.: C, 62.37; H, 5.98; N, 10.39; Ru, 12.40; Cl, 8.77.

Síntesis de RuC11C11.

El producto se preparó poniendo a reflujo el complejo $[\text{Ru}(\text{2,2}'\text{-bpy})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.200 g, 0.38 mmol) y el ligando 4,4'-diundecil-2,2'-bipiridina (0.163g, 0.38mmol) en 30 mL de una disolución de etanol durante 18 h. Después de este tiempo, se obtuvo un precipitado naranja microcristalino con un alto rendimiento: 80%. $^1\text{HMRN}$ en cloroformo deuterado, CDCl_3 : δ 0,77 (br t, $J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 1,17 (m br, 32H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 1.62 (q, $J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 2.74 (t, $J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 7.22 (d, $J_{\text{HH}} = 4.5$ Hz, 2H, 5- y 5'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7,37 (m, 4H, 5- y 5'-CH de bpy), 7,50 (d br, 2H, 6 y 6'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7,72 (m, 4H, 4 y 4'-CH de bpy), 8.00 (t, $J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, 6- y 6'-CH de bpy), 8.47 (s, 2H, 3- y 3'-CH de bpy sustituido alquilo), 8,56 (d, $J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 4H, 3- y 3'-CH de bpy). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (CDCl_3): δ 14.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.9-30.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_3$), 35.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_3$), 123.8, 124.1, 128.1, 129.1 (3- o 3'- y 5- o 5'-CH de bpy), 137.9 (4 y 4'-CH de bpy), 150.7, 151.3, 151.4 (4 o 4'- o 6- o 6'-CH de bpy), 155.0, 156.1, 156.7 (2- o 2'-CH de bpy). Análisis elemental para $\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{Ru}$: calc.: C, 65.80; H, 7.22; N, 8.85; Ru, 10.65; Cl, 7.47.

Síntesis de los ligandos C1C19 y C19C19.**Ligando C19C19**

Se añadió N-Butil-Litio, n-BuLi, 1,6 M en hexano (2,5 equiv., 2,35 ml, 3,75 mmol) a una solución de diisopropilamina, $^i\text{Pr}_2\text{NH}$, (2,5 equiv., 0,55 ml, 3,75 mmol) en tetrahidrofurano, THF, seco (~ 10 ml) a -78°C , lo que dio como resultado in situ formación de diisopropilamida de litio (LDA). A continuación, se añadió una disolución de 4,4-dimetil-2,2-bipiridina (1,00 equiv., 278 mg, 1,5 mmol) en THF (15 ml) y la solución se calentó a 0°C en un baño de hielo,

agitando a esta temperatura durante 1 hora. Más tarde, se añadió 1-bromo octadecano (1,04 g, 3 mmol) y se mezcló a 0 °C durante 1 hora. Después de eso, la mezcla de reacción, contenida en un matraz equipado con un condensador de reflujo, se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió luego a temperatura ambiente después de inactivar la reacción con 2 ml de metanol, MeOH. Se añadieron 50 ml de H₂O y el precipitado resultante se filtró. El filtrado se extrajo con dietil éter (3 x 25 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 25 ml). Antes de mezclar, todas las fracciones orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron el disolvente en un rotavapor para dejar el producto bruto como un sólido de color crema. Este crudo, combinado con el precipitado recogido previamente, se extrajo con éter de petróleo (3 x 50 ml) y se centrifugó. El sólido recogido se recrystalizó en etanol absoluto para dar el producto final como un sólido coloidal de color blanco (659 mg, 64%). Los datos espectroscópicos concuerdan con los suministrados por James Bowers y colaboradores⁴.

Ligando C1C19

Este ligando se preparó siguiendo un procedimiento análogo al descrito para el ligando C19C19, pero usando 4,4-dimetil-2,2-bipiridina (281 mg, 1,515 mmol), 1,05 equiv de diisopropilamida de litio (LDA, n-BuLi 1,6 M en hexano (1 mL, 1.591 mmol), ⁱPr₂NH (238 µL, 1.591 mmol)) para la desprotonación, y 1 equivalente de 1-bromo octadecano (526 mg, 1.515 mmol) para la alquilación, con una cantidad correspondiente de THF seco en todos los casos. El ligando C1C19 se obtuvo como un sólido coloidal de color marrón (416 mg, 63% de rendimiento). Los datos espectroscópicos concuerdan con los suministrados por James Bowers y colaboradores⁴.

Síntesis del complejo RuC1C19.

El producto se preparó poniendo a reflujo $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (112 mg, 0,231 mmol) y 4-metil-4'-nonadecil-2,2'-bipiridina (101 mg, 0,231 mmol) en 25 ml de etanol durante 18 horas a 90 °C. Después de este tiempo, el disolvente se eliminó por evaporación al vacío y se recrystalizó en acetonitrilo. El compuesto $[\text{Ru}(2,2'\text{-bpy})_2(4\text{-CH}_3\text{-4'-(C}_{19}\text{H}_{39})\text{-2,2'-bpy})]\text{Cl}_2$ se obtuvo como un sólido naranja oscuro con buen rendimiento (180 mg, 85%) ^1H NMR (CD_3OD): δ 0.80 (t, $J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 1.18 (m br, 32H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 1.65 (q, $J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 2.56 (s, 3H, CH_3), 2.79 (t, $J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 7.25 (t, $J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, 2H, 5,5'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7.46 (m, 4H, 5,5'-CH de bpy), 7.62 (m, 2H, 6,6'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7.64 (t, $J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, 4H, 4,4'-CH de bpy), 8.06 (m, 4H, 6,6'-CH de bpy), 8.59 (s, 2H, 3,3'-CH de bpy sustituido con alquilo), 9.07 (d, $J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 4H, 3,3'-CH de bpy). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): δ 14.6 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 20.5 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.6 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 32.1 – 32.5 (varios s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 34.2 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36.5 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 54.3 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 125.0 – 131.2 (varios s, 3,3' or 5,5'-CH de bpy), 140.9 (s, 4,4'-CH de bpy), 153.2 – 160.1 (varios s, 2,2' or 6,6'-CH de bpy). Masa molecular del $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{Ru}$, 850.42 obtenida por ESI-MS.

Síntesis del complejo RuC19C19.

El producto se preparó poniendo a reflujo $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (154,5 mg, 0,295 mmol) y 4,4'-dinonadecil-2,2'-bipiridina (203,1 mg, 0,295 mmol) en 25 mL de una disolución de etanol durante 18 horas a 90 °C. Después de este tiempo, el disolvente se eliminó por evaporación al vacío y se

recristalizó en acetonitrilo. El compuesto $[\text{Ru}(\text{2,2'-(C}_{19}\text{H}_{39})_2\text{-2,2'-bpy})]\text{Cl}_2$ se obtuvo como un sólido rojo/marrón con buen rendimiento (325 mg, 94 %). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 0.79 (t, $J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 1.18 (m br, 64H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 1.64 (q, $J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 2.69 (t, $J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$), 7.32 (d, $J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 2H, 5,5'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7.47 (m, 4H, 5,5'-CH de bpy), 7.53 (d, $J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 2H, 6,6'-CH de bpy sustituido con alquilo), 7.72 (d, $J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 4H, 4,4'-CH de bpy), 8.02 (t, $J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, 6,6'-CH de bpy), 8.52 (s, 2H, 3,3'-CH de bpy sustituido con alquilo), 8.62 (d, $J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 4H, 3,3'-CH de bpy). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): δ 14.5 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 18.4 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.8 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30.4 – 30.8 (varios s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 33.1 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36.3 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 58.3 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 125.6 (s, 3,3'-CH de bpy), 128.9 (s, 5,5'-CH de bpy), 139.1 (s, 4,4'-CH de bpy), 151.9 – 158.7 (varios s, 2,2'- or 6,6'-CH de bpy). Masa molecular del $\text{C}_{68}\text{H}_{100}\text{N}_6\text{Ru}$ 1102.71, obtenida por ESI-MS.

-Ácido desoxirribonucleico (ADN)

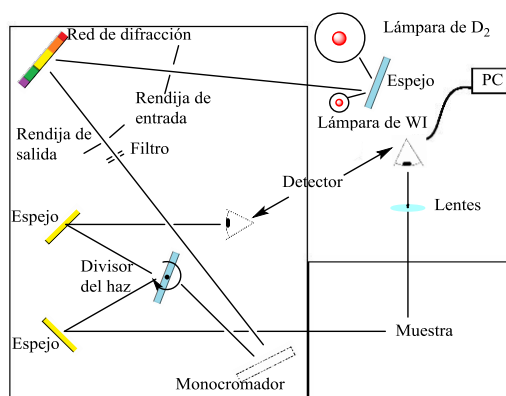
El ADN utilizado se encuentra como sal sódica y procede de timo de ternera (calf thymus). Fue adquirido de la marca comercial Sigma-Aldrich (73049-39-5). La concentración de polinucleótido, referida a pares de bases, se determinó espectrofotométricamente a partir del dato conocido de absorción molar, $6600 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ a 260 nm. Se obtuvo un número promedio de pares de bases por molécula de ADN de 10.000 pb a partir de una experiencia de electroforesis de agarosa en gel, usando bromuro de etidio como indicador. Las relaciones entre la absorbancia a 260 y 280 nm de las disoluciones se encontraron entre 1,7 y 1,8, lo que sugiere la ausencia de proteínas⁵.

Todas las disoluciones que se han preparado en esta tesis, se han hecho empleando Agua Mili-Q como disolvente. Esta agua desionizada se ha obtenido a partir de un sistema Millipore Milli-Q y tiene una conductividad menor que $10^{-6} \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$.

2.2 Técnicas experimentales.

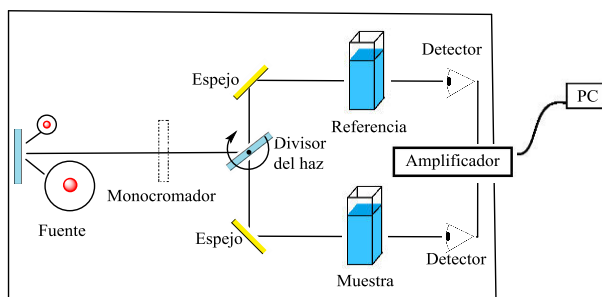
2.2.1 Espectroscopía de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro Hitachi F2500. Este equipo se encuentra conectado a un ordenador que nos permitió analizar los resultados obtenidos. Para controlar la temperatura a la cual se realizan los estudios, el aparato cuenta con una cámara de termostatación, conectada a un criostato Lauda. Este equipo funciona en una configuración como la que se muestra en el siguiente esquema. Las medidas se han realizado a una temperatura de $298.0 \pm 0.1 \text{ K}$, el potencial de la lámpara se varió entre 400 y 700V dependiendo de la experiencia que se realiza, la cubeta que se emplea es de cuarzo con un paso de luz de 10mm.



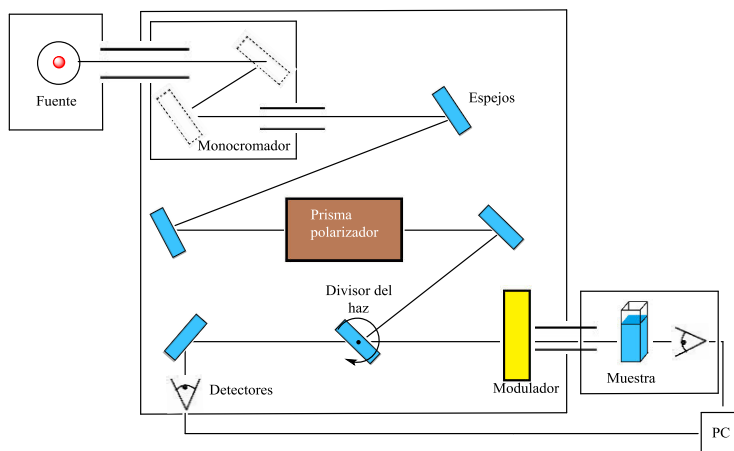
2.2.2 Espectros de absorbancia.

Las medidas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro Cary 500 Scan, UV-Vis-NIR Spectrophotometer, el cual ofrece una sensibilidad muy alta. Este equipo se encuentra conectado a un ordenador que nos permitió la adquisición y análisis de los resultados. Funciona en una configuración como la que se muestra en el siguiente esquema. Las medidas se realizaron a una temperatura de 298.0 ± 0.1 K, controlada por una cámara de termostatación conectada a un criostato Lauda. Se empleó una cubeta de cuarzo con un paso de luz de 10mm.



2.2.3 Espectros de dicroísmo circular

Las medidas de dicroísmo circular (DC) fueron realizadas en un espectrómetro Biologic Mos-450, conectado a un ordenador para el tratamiento de datos. La señal medida en DC es la diferencia entre las Abs de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha. Las muestras deben ser ópticamente activas, por lo que deben ser quirales, es decir, no disponer de un plano de simetría. Este equipo funciona con una configuración como la que se muestra en el siguiente esquema.



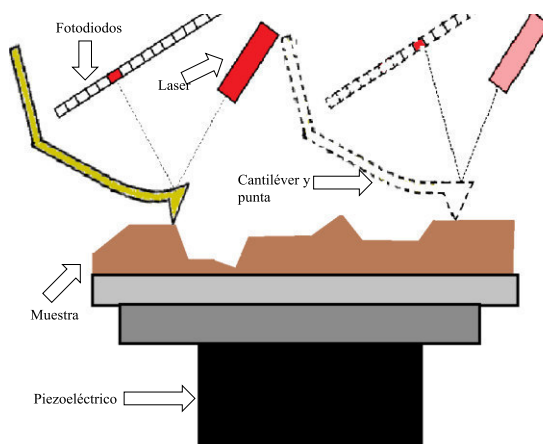
Para obtener los espectros electrónicos de dicroísmo circular (DC) se usó una celda de cuarzo estándar de 10 mm de longitud de camino. Cada espectro se obtuvo a partir de un promedio de 10 ejecuciones a una temperatura fija de 303.0 ± 0.1 K con un equilibrio de 5 minutos antes de cada exploración. La temperatura se controló con una cámara termostatzada conectada a un criostato Lauda.

2.2.4 Microscopía de fuerza atómica (AFM).

Para la obtención de imágenes de microscopía de fuerza atómica, se ha utilizado el modelo Pico Plus 2500 AFM, del fabricante Molecular Imaging. Este equipo se encuentra en los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

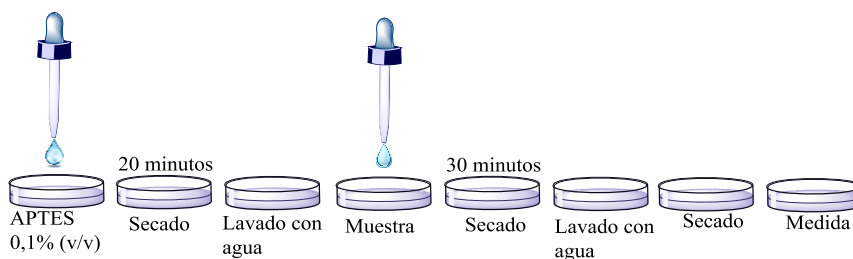
En este tipo de microscopía se sondea la superficie de la muestra con una punta aguda de unas dos micras de largo y un diámetro menor de 100 \AA , que está situada en la parte final de un cantiléver de silicona (modelo Pointprobe, Nanoworld), con 240 KHz de frecuencia de resonancia y una fuerza nominal constante de 42 N/m. La fuerza entre la superficie de la muestra y la

punta provoca que el cantiléver se flexione o doble. Esta flexión que sucede cuando la punta barre la superficie es medida por un detector, obteniéndose con esto un mapa topográfico de 256×256 píxeles.



Las medidas de AFM son llevadas a cabo en aire o modo de repiqueteo (tapping mode), con velocidades de barrido de unos 0,5 Hz. Se usan disoluciones diluidas ($0,30 \mu\text{M}$) para obtener así imágenes nítidas de las moléculas aisladas de ADN. Las imágenes de las muestras se obtienen secando una gota de $30 \mu\text{L}$ de la disolución correspondiente en una mica previamente modificada. Para realizar esta modificación se depositan $60 \mu\text{L}$ de una disolución acuosa de APTES $0,1\%$ (v/v) en una mica recién exfoliada, y se incuba durante 20 minutos. Acto seguido, la superficie se limpia con agua destilada y se seca al aire.

Finalmente, la muestra se deposita en la superficie modificada y se deja en reposo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la mica se lava con agua y se seca al aire antes de ser visualizada.



2.2.5 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Se usan dos microscopios distintos; uno es un TEM Zeiss Libra 120 y el otro un Philips CM-200. Estos dos equipos se encuentran en el servicio de microscopia que ofrece la Universidad de Sevilla a través del CITIUS.

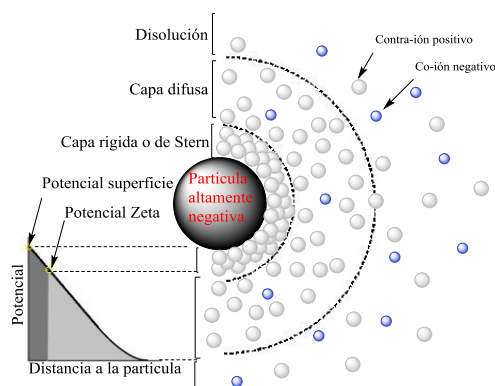
Esta técnica requiere, para conseguir una buena calidad de las imágenes de TEM, que el espesor de la muestra sea lo más reducido posible. Existe una gran variedad de métodos para ello, y la mayoría están basadas en el adelgazamiento homogéneo de las láminas. Se han empleado dos técnicas distintas para la preparación de las muestras, que se describen en los capítulos 5 y 6.

Otro aspecto muy importante para el uso de esta técnica es que se requiere una diferencia de densidad electrónica entre la disolución y nuestra muestra para que se puedan observar nuestros objetos de interés.

2.2.6 Potencial Zeta

Esta magnitud es medida en un equipo Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument Ltd. (UK), que se encuentra en el servicio de Caracterización

Funcional pertenecientes a los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).



El potencial Z se define como la diferencia de potencial que existe entre el límite comprendido entre la capa rígida (o capa de Stern) y la capa difusa (o Gouy y Chapman) y el seno de la disolución. El principio de la técnica utilizada para este tipo de medida se denomina "Laser Doppler Microelectrophoresis", y se basa en la aplicación de un campo eléctrico a una disolución de moléculas, el cual provocará el movimiento de éstas con una velocidad que se relaciona con su potencial Zeta.

Se utiliza una cubeta DTS 1070 con un capilar de policarbonato que se encuentra termostatizada a una temperatura constante de $298,0 \pm 0,1$ K. Se realizan un mínimo de seis medidas de potencial Zeta para cada muestra y se obtiene el valor medio de las mismas.



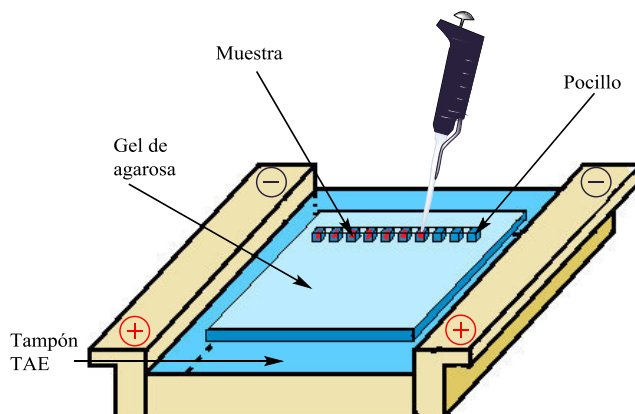
2.2.7 Dispersión dinámica de luz

El tamaño de los vectores preparados es medido con el mismo equipo que el potencial Zeta (Zetasizer), pero en este caso el principio de la técnica para la medida se realiza a través de un proceso de dispersión de luz dinámica. Este proceso parte de la base de que el movimiento browniano de las moléculas o partículas en suspensión provoca que la luz láser sea dispersada con distintas intensidades. El movimiento browniano se puede definir como el movimiento aleatorio observado en las partículas halladas en un medio fluido (gas o líquido), como consecuencia de los choques contra las moléculas del mismo⁶. La muestra es iluminada con un láser con una disposición de detección fija de 90° al centro del área de la celda, y se analiza la fluctuación en la intensidad de la luz dispersa.

A partir del tamaño de las partículas, el programa nos da valores de distribución de los distintos tamaños existentes en la disolución, es decir, de polidispersidad (los valores se encuentran entre 0 y 1, y cuanto mayores sean éstos, mayor es la dispersión de los tamaños). Para la realización de estas medidas se han empleado la misma cubeta que la utilizada en las medidas de potencial zeta (DTS 1070).

2.2.8 Electroforesis en gel de agarosa

El gel se preparó en un tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y agarosa al 1% (p/v) en un volumen total de 180 ml. Se usó Red-Safe (10 μ l) como agente de tinción para la visualización del ADN bicatenario.



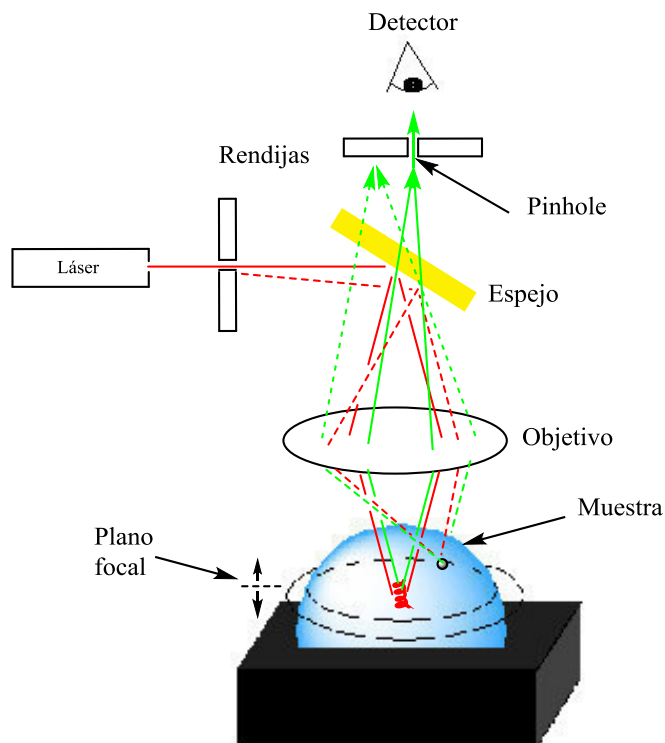
Cada muestra (20 μ l) se mezcló y homogeneizó con 5 μ l de tampón de carga, y esta disolución es cargada en el gel de agarosa fabricado previamente. Las mediciones de electroforesis se llevaron a cabo mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 90 V durante un período de tiempo de 90 minutos. Las imágenes fueron reveladas mediante el uso de un transiluminador Ultima 16si Hoefer.

2.2.9 Microscopia de fluorescencia confocal.

Las medidas fueron realizadas en un microscopio confocal ZEISS LSM 7 DUO. Los objetivos utilizados fueron: 40x/0,95 Corr y 63x/1,40 Oil DIC.

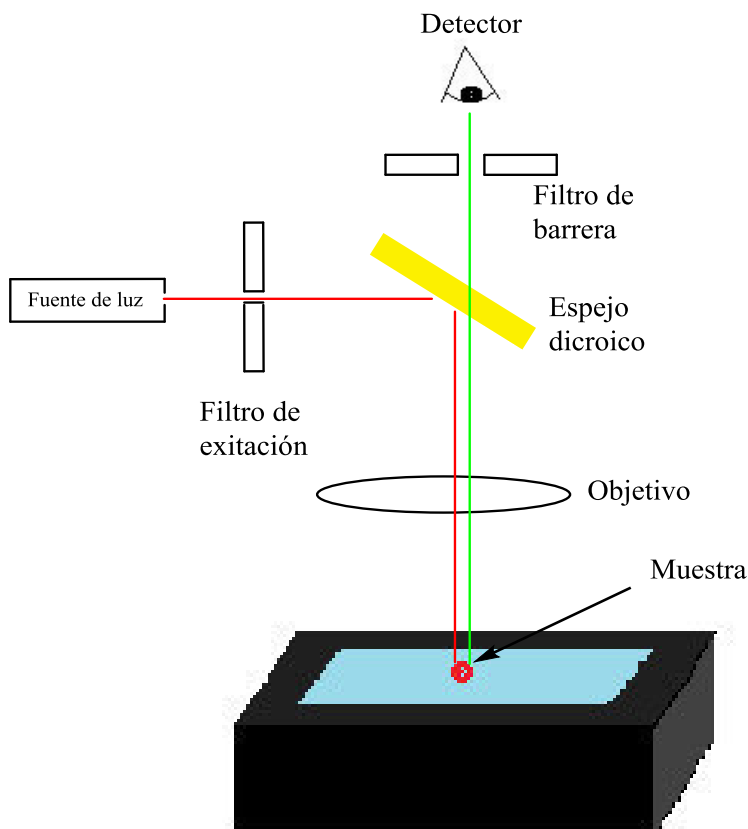
El microscopio confocal emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste utilizando un "pinhole" espacial (líneas continuas en

el siguiente esquema) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en muestras que son más gruesas que el plano focal. El pinhole es una apertura localizada delante del fotomultiplicador que evita el paso de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en el foco. La luz que proviene de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no convergen en el pinhole y, por lo tanto, no es detectada por el fotomultiplicador (líneas discontinuas en el siguiente esquema).



2.2.10 Microscopía de fluorescencia.

Las imágenes se tomaron usando una cámara DP72 unida a un microscopio de fluorescencia Olympus BX61, utilizando lentes de aumento 40x con excitación a 470-490 nm y una banda de detección que varía desde 520 a 700 nm. Las imágenes se analizaron utilizando el software Cellsense Dimension.

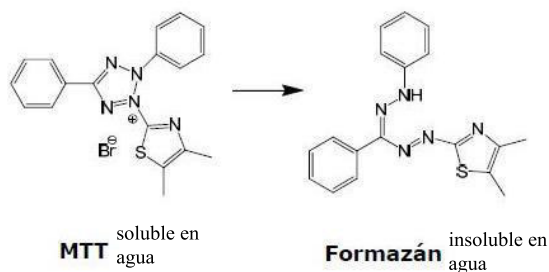


La microscopía de fluorescencia es una herramienta que permite estudiar materiales fluorescentes. La principal ventaja de un microscopio de fluorescencia es que permite irradiar a la muestra con una longitud de onda deseada y después separar mediante el uso de filtros la luz fluorescente emitida (la cual es mucho más débil que la luz de excitación). De esta forma el detector (usualmente una cámara digital) solo detecta la luz emitida. Como

resultado, la parte de la muestra que presenta fluorescencia brilla contra un fondo oscuro con el suficiente contraste como para permitir su detección.

2.2.11 Ensayo de viabilidad celular “citotoxicidad” (Ensayo MTT)

El ensayo colorimétrico de reducción de Bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)⁷, es uno de los métodos más utilizados para la determinación de viabilidad celular (citotoxicidad). El estudio se basa en la reducción del MTT soluble, por parte la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial, a su forma insoluble de formazán. Las células se adhieren a los anillos de tetrazolio y forman los cristales morados de formazán que son insolubles en disolución acuosa. El formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la disolución de las mismas, permitiendo cuantificar la cantidad de MTT reducido por medio de un estudio colorimétrico, ya que debido a su reducción cambia de un color amarillo a morado. La capacidad de las células para reducir el MTT es indicativa de la integridad de las mitocondrias y de su actividad funcional. Se obtiene así una medida de viabilidad celular y de toxicidad, es decir, se puede cuantificar las células que son activas metabólicamente⁸. Un aumento del número de células produce un aumento de la cantidad de formazán MTT formado, lo que implica un aumento de la absorbancia detectada.



El % de viabilidad celular se determina con un espectrofotómetro midiendo el valor de absorbancia a una longitud de onda entre 500-600 nm (la absorbancia máxima depende del disolvente utilizado). Los resultados se expresan cómo % de células vivas:

$$\% = \frac{A_{592} + A_{592 \text{ control (DMSO)}}}{A_{592 \text{ control celular}} + A_{592 \text{ control (DMSO)}}} \quad 2.1$$

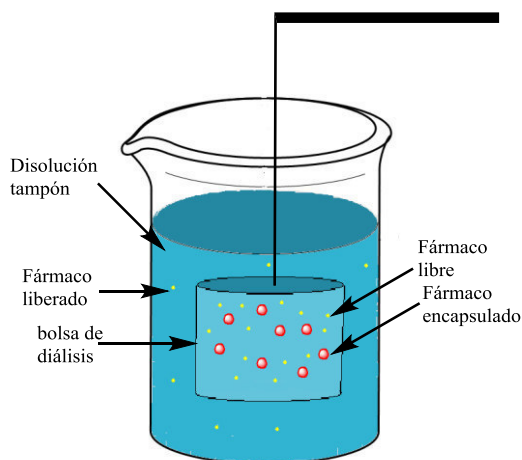
Se debe utilizar un control del medio celular no tratado (% vida celular > 1), un control positivo (compuesto con citotoxicidad conocida) y otro negativo (el disolvente, que en nuestro caso es dimetil sulfóxido, DMSO). Las medidas se hacen por triplicado.

En nuestro caso las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3000 células por placa. Se usaron cinco líneas celulares de cáncer humano y una línea celular normal: A549 (línea celular epitelial basal alveolar humana adenocarcinómica), H358 (línea celular de cáncer de pulmón humano), HepG2 (línea celular de cáncer de hígado humano), LS180 (línea de células epiteliales del colon humanas adenocarcinómicas), MCF7 (línea celular de cáncer de mama) y RPE-1 (línea celular normal). Al día siguiente se agregaron diferentes dosis de disoluciones de las moléculas a evaluar a los pocillos, y la placa volvió a la incubadora durante cuatro días más. La viabilidad celular se midió por espectrofotometría de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada punto se midió por triplicado.

2.2.12 Método de diálisis

La eficacia de encapsulación del fármaco se midió usando un método de diálisis. Para ello se añadieron 600 μ l del vector a estudiar (micela o liposomas) cargados con fármaco a un kit de diálisis Pur-A-Lyzer Midi 1000 (MWCO 1 kDa) de Sigma-Aldrich (también se usó un tubo de diálisis de un valor corte de peso molecular de 12 kDa de Sigma-Aldrich). Los resultados obtenidos empleando los dos sistemas no mostraron diferencia alguna.

La bolsa de diálisis se sumergió en un vaso de precipitado que contenía 30 ml del mismo tampón utilizado para preparar las muestras de estudio. El proceso de diálisis se realizó a una temperatura de 4°C para asegurar la estabilidad del fármaco durante toda la medición. Se tomó una alícuota de 2 ml de la muestra del vaso de precipitado cada 15 minutos. La cuantificación del fármaco se llevó a cabo mediante el uso de espectrometría de absorbancia vis-UV (490 nm para DOX). Las alícuotas tomadas se reemplazaron cada vez por un volumen igual de tampón para mantener constante el volumen de la disolución en el vaso de precipitados.



El proceso de diálisis se llevó a cabo durante un período de tiempo de al menos 24 horas. La eficacia de encapsulación (EE) se obtuvo utilizando las ecuaciones 2.2 y 2.3. Cada medición se llevó a cabo por triplicado.

$$\%EE = \frac{[Farmaco]_{enc}}{[Farmaco]_{total}} \times 100 \quad 2.2$$

$$[Farmaco]_{enc} = [Farmaco]_{total} - [Farmaco]_{tampón} \quad 2.3$$

donde $[Farmaco]_{enc}$, $[Farmaco]_{tampón}$ y $[Farmaco]_{total}$ son las concentraciones del fármaco encapsulado, la concentración del fármaco en la disolución tampón y la concentración total de fármaco añadida a la disolución, respectivamente. Todas las concentraciones se refieren al volumen total.

2.3 Bibliografía.

- (1) Cutts, S. M.; Nudelman, A.; Rephaeli, A.; Phillips, D. R. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life* **2005**, *57* (2), 73–81.
- (2) Sprintschnik, G.; Sprintschnik, H. W.; Kirsch, P. P.; Whitten, D. G. Preparation and Photochemical Reactivity of Surfactant Ruthenium(II) Complexes in Monolayer Assemblies and at Water-Solid Interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (15), 4947–4954.
- (3) Tamura, K.; Sato, H.; Yamashita, S.; Yamagishi, A.; Yamada, H. Orientational Tuning of Monolayers of Amphiphilic ruthenium(II) Complexes for Optimizing Chirality Distinction Capability. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (24), 8287–8293.
- (4) Bowers, J.; Amos, K. E.; Bruce, D. W.; Webster, J. R. P. Surface and Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of Ru(II) Metallosurfactants. 3. Effect of Chain Number and Orientation on the Structure of Adsorbed Films of [Ru(bipy)₂(bipy')]Cl₂ Complexes. *Langmuir* **2005**, *21* (4), 1346–1353.
- (5) W. Saenger. *Principles of Nucleic Structure*; New York, 1984.
- (6) R. Feynman. *The Feynman Lectures on Physics*; Addison Wesley Longman, Ed.; 1970.
- (7) Meerloo, J. Van; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay Johan. *Cancer Cell Cult. Methods Mol. Biol.* **2011**, *731* (3), 237–245.
- (8) Jiménez, J.; González, N.; Fernández, M.; Elvira, C.; López, A.; San Román, J. Estudio de La Biocompatibilidad in Vitro de Polimeros Metacrílicos Derivados de Pirrolidona/ina. *Biomecánica* **2007**, *15* (1), 63–71.

Capítulo 3º.

Complejo de inclusión
(pseudorrotaxano)

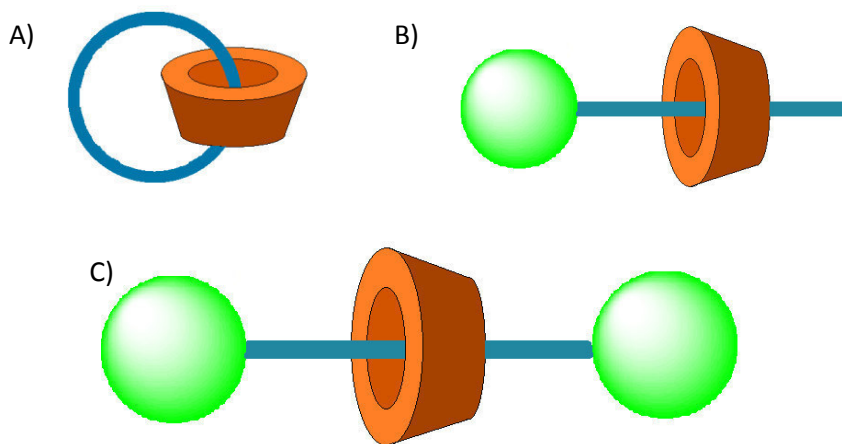
En las últimas décadas un gran número de investigadores ha buscado mimetizar la naturaleza en lo que se refiere a la dinámica de moléculas dentro de un organismo. Un caso particular de estos sistemas es lo que se denomina motores moleculares, un tipo de maquina molecular¹. El mecanismo de funcionamiento de una máquina molecular se caracteriza por ser un proceso cíclico, es decir, el punto de partida y el final es el mismo y su movimiento viene precedido por un estímulo externo que puede ser químico, fotoquímico, electroquímico o una variación en el pH^{2,3}. Un ejemplo típico de estos motores moleculares en la naturaleza es la enzima ATP sintasa⁴, cuya rotación está impulsada por gradientes de pH (cada rotación de 120° provoca un cambio en la enzima que favorece la reacción de formación de ATP). El modelo más sencillo de motor molecular es el que está compuesto por una molécula cíclica que rota entorno a un eje.

Moléculas cíclicas como ciclodextrinas (CDs)^{5,6}, calixarenos⁷ y éteres corona⁸ presentan unas propiedades características debido a su estructura molecular. En general todas estas moléculas tienen una cavidad con cierto carácter apolar. Además, también poseen una parte externa que es hidrofílica. Estas moléculas pueden actuar como receptores, formando complejos de inclusión con una gran variedad de especies⁹⁻¹². El estudio de estos complejos es bastante interesante ya que entran en juego interacciones de uniones no covalentes entre el huésped y el receptor. Estas interacciones pueden ser de tipo dipolo-dipolo, o de van der Waals, y puentes de hidrogeno¹³.

Se pueden construir distintos tipos de complejos de inclusión dependiendo de las características estructurales y de la molécula huésped. Así, se pueden formar:

- i. Complejo de inclusión en el que la molécula huésped es otro macrociclo que se encuentra cerrado y enlazado al receptor. La interacción entre ellos es no covalente. Este tipo de complejos se denominan catenanos¹⁴ (ver

Esquema 3.1 A)). Esta compuestos pueden estar formados por más de dos moléculas macrocíclicas enlazadas entre si obteniéndose una estructura en forma de cadena, es por esto que en estos complejos a cada macrociclo se les denomina eslabones¹⁵.



Esquema 3.1 ejemplo de máquinas moleculares: A) catenano; B) pseudorotaxano; C) rotaxano.

- ii. Complejo de inclusión en los que la molécula huésped es lineal. Esta actúa como molécula-eje y se localiza insertada en la cavidad del macrociclo. Dependiendo de la estructura de las moléculas lineales se tienen diferentes complejos, puesto que pueden estar presentes o no grupos voluminosos terminales en los extremos de la molécula que actúa como eje. De esta forma podemos tener:

1-Los rotaxanos son complejos de inclusión donde la molécula lineal que se encuentra intercalada dentro del macrociclo posee dos grupos terminales (grupos bloqueadores), que son voluminosos e impiden la salida del anillo de su interior (ver Esquema 3.1 C)).

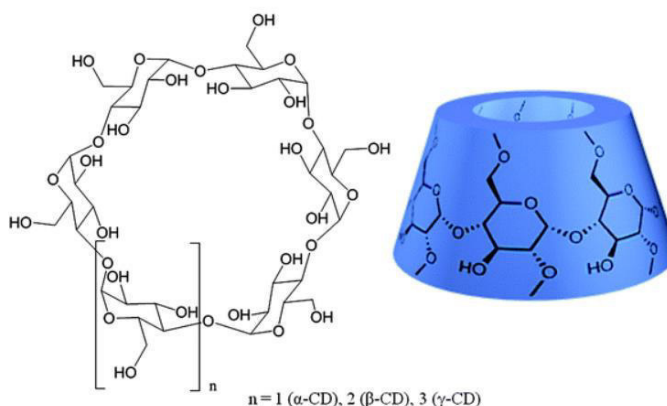
2-Pseudorotaxano son complejos de inclusión donde la molécula lineal que se encuentra intercalada dentro del macrociclo no posee grupo

bloqueador en los extremos o solo lo posea en uno de ellos (ver Esquema 3.1 B)).

Las moléculas que actúan como eje pueden ser bastante largas como para que se produzca la formación de polirotaxanos y pseudopolirotaxanos¹⁶.

La principal característica que rige a los compuestos catenanos, rotaxanos y pseudorotaxanos es que la molécula macrocíclica pueden rotar en torno a la molécula que actúa como eje. Esta propiedad hace de estos agregados unos buenos prototipos de máquinas moleculares, ya que están constituido por un eje y una rueda.

Como se ha comentado, las ciclodextrinas son unos macrociclos muy usados como anillos en este tipo de complejos. Sus características se comentaron anteriormente (página 39)¹⁷.



Esquema 3.2. Estructura de la ciclodextrina.

Como se ha comentado, en la formación de un rotaxano y un pseudorotaxano se requiere la presencia de una molécula lineal que actúe como eje de estos complejos. Dada su estructura, los tensioactivos pueden desempeñar la función de molécula-eje, ya que estas moléculas tienen una

cabeza polar, que pueden actuar como grupo terminal, además de una cadena alquílica que puede hacer las funciones de eje. Valente y colaboradores¹⁸ realizaron una revisión de la formación de los complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y los tensioactivos. En este trabajo se muestra la dependencia de esta interacción de diferentes factores como puede ser la longitud de la cadena alquílica de los tensioactivos, la ciclodextrina empleada o el número de cadenas alifáticas. Por otro lado, las aplicaciones prácticas de estos sistemas son muy diversas. Como ejemplo, Mary Jo Weiss-Errico y Kevin E. O'Shea¹⁹ proponen un futuro empleo de las ciclodextrinas para la purificación de agua de compuestos perfluorocarbonos, PFCs, o perfluoroalcanos. Para ello, realizaron un estudio de la interacción de las ciclodextrinas con ácidos carboxílicos con cadenas alquílicas fluoradas.

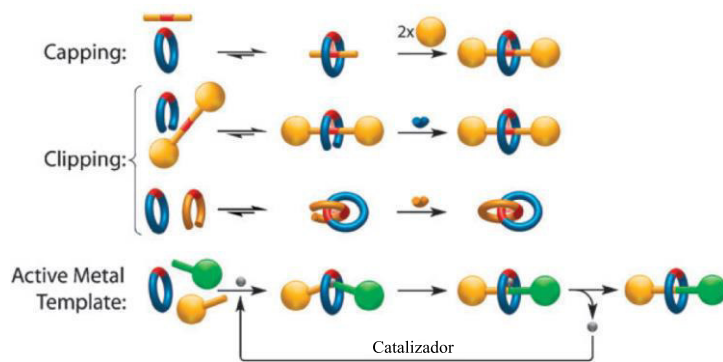
Existen tres alternativas para sintetizar complejos de inclusión²⁰ (ver Esquema 3.3):

a) El método de capping. En este método se aprovecha la formación de un enlace covalente entre la molécula eje de un pseudorotaxano y dos grupos voluminosos que se enlazan en los extremos del eje, dando lugar al correspondiente rotaxano. Estos grupos voluminosos evitan la disociación del macrociclo, y para que se produzca la pérdida de la estructura, es necesario romper un enlace covalente.

b) El método de clipping. En este método se obtiene el complejo de inclusión a través de una macrociclación de un ligando no cíclico alrededor de la molécula-eje, la cual ya tiene unido los grupos bloqueantes en cada extremo de la misma.

c) El método del *active metal template*. En este método el metal utilizado actúa como sustrato y promueve la formación del enlace

covalente (como catalizador), crucial para la obtención de los complejos de inclusión.



Esquema 3.3. Estrategia modelo para la síntesis de catenanos, rotaxanos y pseudorotaxano.

El método de síntesis b) no es válido para los casos en los que se empleen las ciclodextrinas como molécula macrocíclica. Como se describe, método a) tiene dos etapas: un primer paso que comprende la síntesis de pseudorotaxanos y un segundo paso en el que se une otro grupo de cabeza o agente bloqueante. Ésta es la vía de síntesis utilizado por V. I. Martin y colaboradores²¹ para la formación de rotaxanos de ciclodextrinas como molécula macrocíclica y tensioactivos como molécula-eje. Este modelo de síntesis también lo utilizaron autores como Toshiaki Taira y colaboradores²² en la preparación de polirrotaxanos. Se ha observado que en los dos casos citados anteriormente, los grupos bloqueantes empleados en la segunda etapa son complejos metálicos.

En este capítulo nuestro principal propósito consistirá en evaluar la formación de complejos de inclusión de tipo pseudorotaxanos entre ciclodextrinas y metalotensioactivos. También se determinarán las constantes de interacción de formación de estos complejos, así como la influencia que muestra la presencia de ciclodextrina en la formación de agregados micelares.

Para la realización de este estudio se van a emplear como moléculas macrocíclicas la α , β y γ -ciclodextrinas. Por otro lado, se van utilizar como moléculas-eje cuatro metalosurfactantes derivados del complejo inorgánico $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Estos tensioactivos se diferencian entre sí en el número de cadenas alifáticas y en la longitud de estas cadenas. Así tenemos:

- $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4\text{-CH}_3\text{-4}'\text{-(C}_{11}\text{H}_{23})\text{-2,2'-bipy})]^{2+}$ (RuC1C11).
- $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4,4'\text{-(C}_{11}\text{H}_{23})_2\text{-2,2'-bipy})]^{2+}$ (RuC11C11).
- $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4\text{-CH}_3\text{-4}'\text{-(C}_{19}\text{H}_{39})\text{-2,2'-bipy})]^{2+}$ (RuC1C19).
- $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_2(4,4'\text{-(C}_{19}\text{H}_{39})_2\text{-2,2'-bipy})]^{2+}$ (RuC19C19).

Los tensioactivos usados presentan una propiedad muy relevante. Esta propiedad se debe a la presencia del complejo metálico de rutenio que actúa como parte hidrófila (cabeza). Debido a esto, Estos tensioactivos muestran unas propiedades fotofísicas que permiten seguir la evolución de los sistemas en los distintos medios involucrados sin la necesidad de la adición de una sonda externa. Esto es muy interesante dado que la adición de una molécula externa, que nos permita seguir una interacción ajena a esta, modifica el sistema estudiado.

El complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ tiene las siguientes propiedades fotofísicas²⁴: absorbe la luz ultravioleta visible. En medio acuoso, la molécula absorbe a 452 ± 3 nm correspondiente a la transición $\pi_M \rightarrow \pi_L^*$ y a 285 nm correspondiente a la transición $\pi_L \rightarrow \pi_L^*$ centrada en el ligando. El estado excitado se relaja al estado fundamental mediante la emisión de un fotón a una longitud de onda de 620 nm²⁵.

3.1 Experimental.

La síntesis y estructura de estos metalosurfactantes se encuentran descritos en el capítulo 2 de esta tesis.

Todas las mediciones se realizaron a pH 7 (tampón de cacodilato/NaCl, $I = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) y a una temperatura de $298.0 \pm 0.1 \text{ K}$.

3.1.1 Medidas de absorbancia.

Las medidas de absorbancia se realizaron a una concentración de tensioactivo de $1.00 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y se recogió el espectro en un intervalo de longitud de onda de 350-550 nm.

3.1.2 Medidas de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia se realizaron siguiendo la intensidad de emisión del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, la cabeza hidrofóbica de los tensioactivos sintetizados. La longitud de onda de excitación usada es de 456 nm para todos los tensioactivos, y se recogió la emisión en un intervalo de 200 nm (desde 500 a 700 nm).

3.1.2.1. Estudio de la auto-agregación (formación de micelas): La concentración de tensioactivo catiónico usada se varió dentro del intervalo de $8.00 \cdot 10^{-8}$ a $1.60 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC11C11, $5.00 \cdot 10^{-7}$ a $6.50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC1C11, $5.00 \cdot 10^{-9}$ a $2.00 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC19C19 y de $1.50 \cdot 10^{-7}$ a $7.00 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC1C19.

3.1.2.2. Estudio de la interacción de los tensioactivos con las ciclodextrinas: Se usó una concentración fija de $4,50 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para los tensioactivos de cadena corta RuC1C11 y RuC11C11, y de $2,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para los de cadena larga, RuC1C19 y RuC19C19. En todos los casos, las concentraciones de tensioactivo utilizada fue inferior a la CMC, con el fin de evitar la presencia de agregados micelares en las disoluciones. La concentración de CDs varió en el intervalo de 0 a $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para los cuatro tensioactivos y las tres ciclodextrinas (α -CD, β -CD y γ -CD).

3.1.2.3. Medidas de quenching: la concentración del desactivador de fluorescencia ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) varió desde 0 hasta $3,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.1.3 Espectros de RMN.

Las medidas se realizaron a una concentración de tensioactivo lo más cercana posible a la solubilidad de éstos dada la baja sensibilidad de la técnica. Las concentraciones empleadas fueron $1,20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC11C11, $1,40 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC1C11, $8,60 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC19C19 y $9,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC1C19. Las concentraciones de ciclodextrina empleadas fueron: $6,60 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para la α -CD, $5,70 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para la β -CD y $5,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para γ -CD.

3.2 Resultados y discusión

En la Figura 3.1 se recogen los espectros de absorción de los cuatro metalosurfactantes utilizados y del complejo $[\text{Ru}(2,2'\text{-bpy})_3]^{2+}$. Como se puede observar, la diferencia entre los espectros es muy sutil. Según Valenty y colaboradores²⁶, los ligandos (2,2'-bipiridina) sustituidos con grupos alquilo son electrónicamente muy similares a los ligandos sustituidos con alquilo 2,2'-bipiridina sin grupos adicionales.

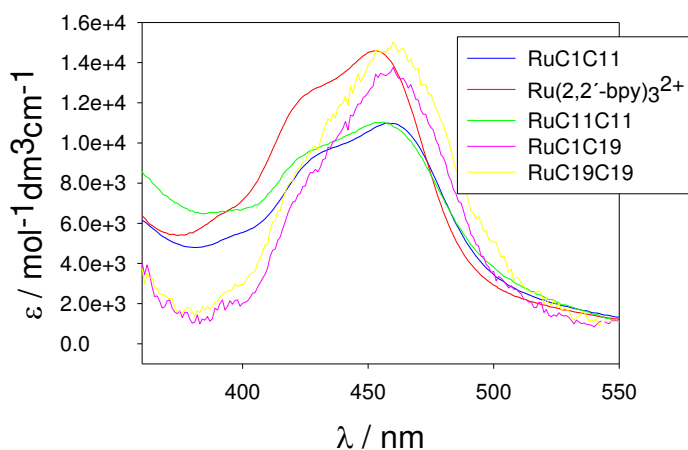


Figura 3.1. Espectro de absorción de los cuatro metalosurfactantes y del complejo metálico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

La diferencia en los espectros de absorción puede deberse a la orientación que pueden presentar los sustituyentes de los ligandos de dichos metalosurfactantes en disolución, lo cual produce cambios en las transiciones en el complejo de transferencia de carga metal a ligando, TCML. El hecho de que los metalosurfactantes sean fluorescentes permitió obtener información sobre los procesos de agregación de los mismos mediante medidas de emisión de fluorescencia. Es importante obtener dicha información antes de realizar estudios posteriores.

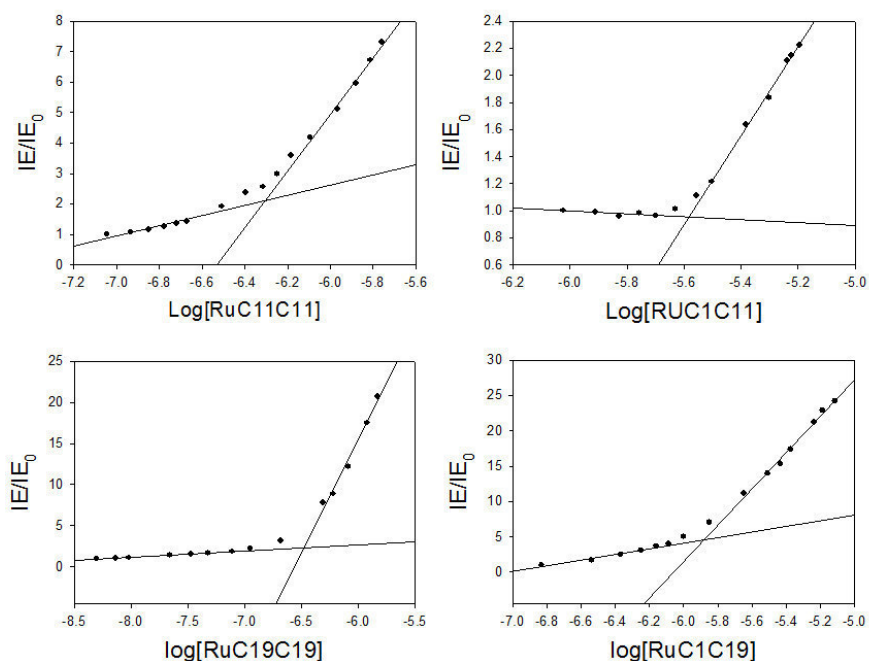


Figura 3.2. Determinación de la CMC de los distintos metalosurfactantes.

El valor de concentraciones de tensioactivo al que podemos apreciar la formación de las primeras micelas se denomina concentración micelar crítica (CMC). En la introducción de la tesis se describió la formación de estos agregados. Para la determinación de la CMC se realiza la experiencia de recoger la intensidad de emisión de los metalosurfactantes a distintas concentraciones de éstos. El valor de CMC se obtiene a partir del punto de intersección de las tendencias lineales que se obtienen, antes de la CMC y después (ver Figura 3.7Figura 3.2). Los valores de CMC para los distintos tensioactivos se muestran en la Tabla 3.1. Se observa una dependencia de la longitud y el número de cadenas alifáticas. Este comportamiento se puede explicar prestando atención a las interacciones responsables de la formación de estos agregados. Las interacciones electrostáticas repulsivas debidas a la

cabeza de los tensioactivos son semejante para los cuatro metalosurfactantes mientras que las interacciones hidrofóbicas atractivas debidas a las cadenas

Tabla 3.1. Muestra los valores de CMC para los distintos tensioactivos.

Tensioactivo	CMC/mol·dm ⁻³
RuC11C11	$(5.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$
RuC1C11	$(2.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-6}$
RuC19C19	$(3.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$
RuC1C19	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$

hidrocarbonadas son distintas²⁷. Se aprecia que el valor más bajo de la CMC es el que corresponde al RuC19C19, es decir, al tensioactivo que tiene las dos cadenas alifáticas de mayor longitud. Este resultado se explica en base a una mayor interacción hidrofóbica entre las moléculas de tensioactivo en el interior micelar, por lo que los agregados micelares aparecen a concentraciones menores de tensioactivo. El mismo razonamiento permite explicar que el valor más alto de la CMC corresponda al metalosurfactante que posee tan solo una cadena alifática de once átomos de carbono. Los datos de la Tabla 3.1 indican también que la CMC de los tensioactivos simétricos es menor que la de los asimétricos. De nuevo son las interacciones hidrofóbicas, más favorables en el primer caso, las que explican este resultado.

La Figura 3.3. muestra los cambios observados en la CMC de los tensioactivos en presencia de diferentes concentraciones de ciclodextrinas.

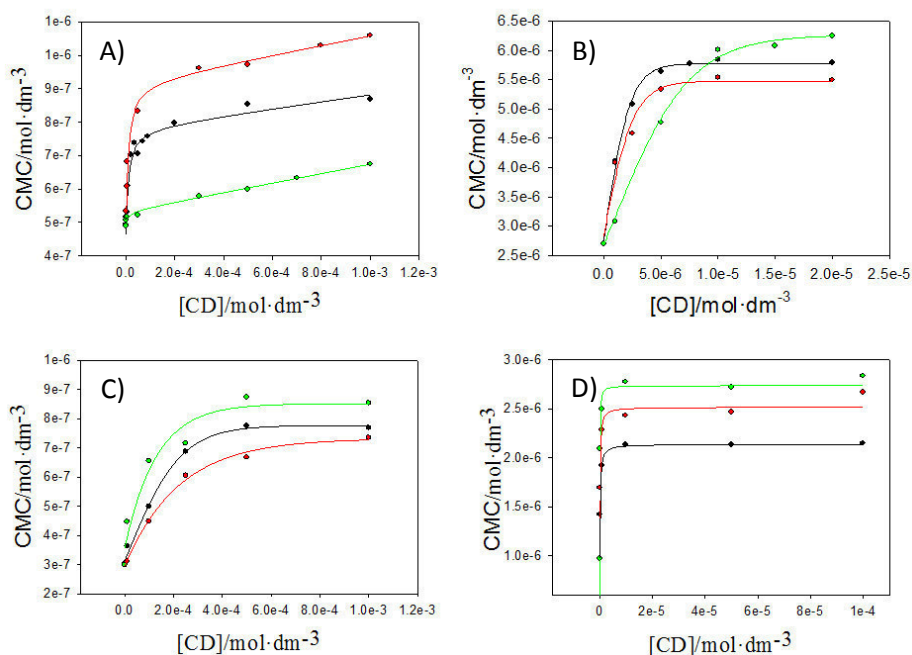


Figura 3.3. Variación de la CMC en presencia de las tres ciclodextrinas para los distintos tensioactivos: A) RuC11C11, B) RUC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19. (●) α -CD, (●) β -CD, (●) γ -CD.

Se observa un considerable aumento de los valores de la CMC cuando $[\text{CD}]$ aumenta a valores bajos de concentración de ciclodextrinas. Sin embargo, se aprecia que los valores de la CMC permanecen prácticamente constante cuando varía $[\text{CD}]$ a concentraciones altas de ciclodextrina. Los resultados indican claramente la existencia de interacción entre los monómeros de los tensioactivos y las ciclodextrinas, puesto que la presencia de las CDs afecta a la auto-asociación de los metalosurfactantes. Se produce la formación de complejos de inclusión tensioactivo/CD donde las cadenas hidrofóbicas del tensioactivo se introducen en la cavidad poco polar del macrociclo. A estos complejos se denomina pseudorotaxanos. La formación de estos supone una disminución de la concentración de monómeros en disolución, por lo que se requiere una mayor concentración de tensioactivo para que se formen las

micelas. Este hecho explica que a valores bajos de concentración de CD, la variación de la CMC sea grande. La independencia de la CMC de la concentración de CD, a altas concentraciones del macrociclo, podría deberse a que los complejos de inclusión formados también contribuyen a la formación de las micelas²⁸.

Se puede determinar la constante de interacción de los tensioactivos con las ciclodextrinas (la constante de formación de complejos de inclusión tensioactivo/ciclodextrina) mediante el uso de la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN).^{23,24} Para este tipo de estudios es necesario el uso de elevadas concentraciones de las especies huésped y/o hospedador. Teniendo en cuenta que las CMCs obtenidas para los metalosurfactantes sintetizados tienen valores $<1.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, este tipo de estudio no pudo llevarse a cabo dada la baja sensibilidad mostrada por la técnica. Sin embargo, a partir de medidas de RMN ROESY (Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy), se puede poner de manifiesto la formación del complejo de inclusión tensioactivo/ciclodextrina. Como se puede observar en los espectros de ROESY realizados (ver Figura 3.4) existe interacción entre los protones de la cadena alquílica de los tensioactivos (que aparecen a un valor de desplazamiento químico, δ , entre 1.20 y 1.28) y los protones 5-H y 3-H de la cavidad interna de la ciclodextrina, que aparecen a un valor de δ de 3.80 y 3.95, respectivamente. Esto demuestra que la cola alifática de los tensioactivos entra en la cavidad del anillo formándose un pseudurrotaxano.

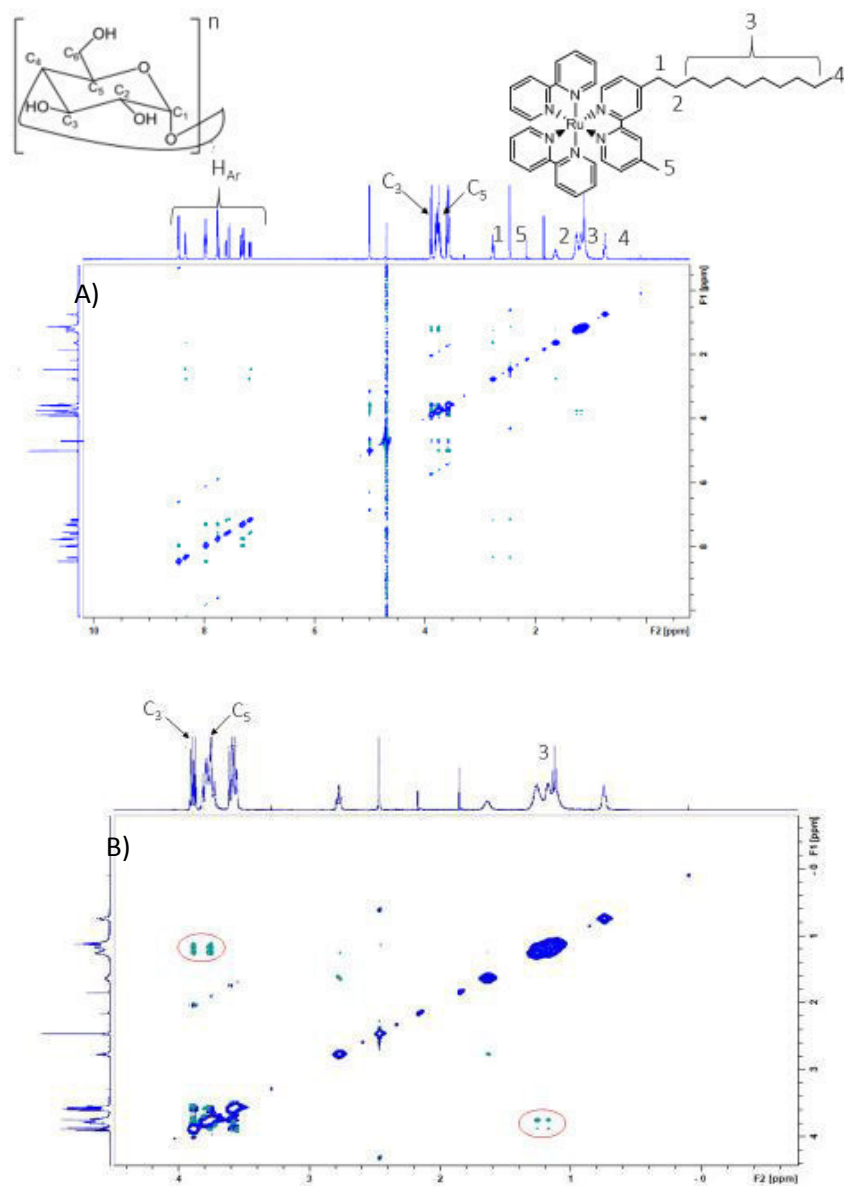


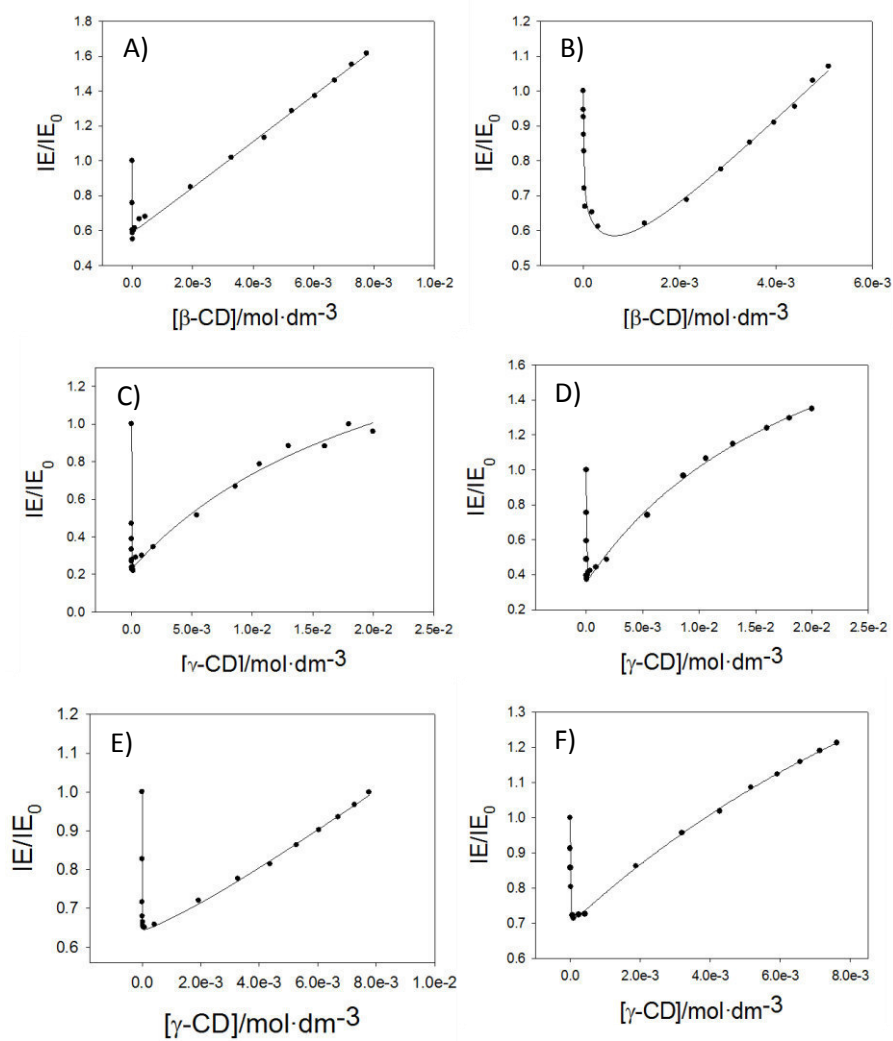
Figura 3.4. RMN bidimensional ROESY del tensioactivo RuC1C11 con α -ciclodextrina. A) Señal de todos los protones, B) ampliación de la zona de interés

Resultados análogos a estos se han obtenido para todos los tensioactivos, observándose la interacción entre los protones de las cadenas

alquílicas de los metalosurfactantes y los protones internos de las moléculas de ciclodextrina.

Otra forma de determinar cuantitativamente la constante de formación de estos complejos es mediante el uso de datos de conductividad²¹. Sin embargo, en este caso nos volvemos a encontrar con la limitación de los valores tan bajos de CMCs que presentan nuestros sistemas. El mismo problema experimental no permitió la determinación de la estequiometría de los complejos formados mediante el uso del método de Job²⁹.

Los inconvenientes presentados anteriormente para la cuantificación de las constantes de interacción nos llevaron a la realización de otro tipo de experiencias. Se llevó a cabo un estudio fluorimétrico donde se mantuvo constante la concentración de los tensioactivos (se trabajó siempre a concentraciones por debajo de valor de la CMC) y se varió la concentración de ciclodextrina presente en la disolución. La Figura 3.5. recoge los resultados obtenidos. En esta figura se pueden apreciar tres tendencias distintas: i) una primera disminución de la intensidad de emisión a valores bajos de concentración de CDs, ii) una segunda zona donde la intensidad de emisión prácticamente no varía, zona constante, y iii) una última región de concentraciones más altas de CDs en la que se observa un incremento de la intensidad de emisión al aumentar la concentración de ciclodextrina. Un comportamiento similar es observado para los cuatro tensioactivos y la tres ciclodextrinas estudiadas, pero con algunas diferencias. La diferencia más clara está relacionada con la zona constante obtenida para los tensioactivos de cadenas largas, RuC1C19 y RuC19C19. El intervalo de concentraciones de CDs en el que ocurre dicha constancia es mayor cuanto más larga es la cadena hidrofóbica de los tensioactivos. Por otro lado, también se puede extraer de los resultados que no solo se forman complejos de inclusión con estequiometría 1:1.



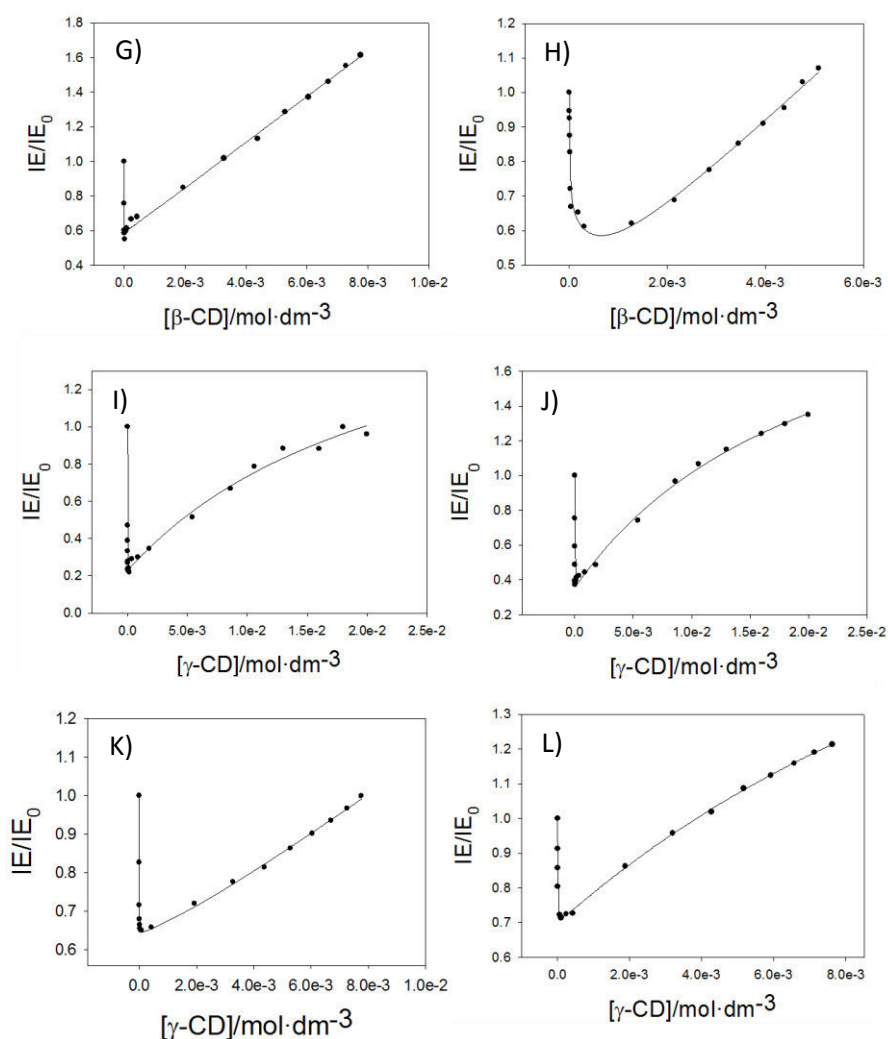


Figura 3.5. Dependencia de la intensidad de emisión relativa de fluorescencia de los metalotensioactivos de la concentración de CD. Los gráficos A), E), e I) corresponden a la interacción de las ciclodextrinas con el tensioactivo RuC11C11; B), F), y J) para RuC1C11; C), G), y K) para RuC19C19; y D), H), y L) para RuC1C19.

Con el fin de cuantificar dicha interacción a partir de los datos de intensidades de emisión obtenidas, se hizo uso del Modelo de Pseudofase. Teniendo en cuenta el equilibrio:



se puede deducir la expresión dada en la ecuación 3.2:

$$IE = \frac{IE_o + IE_1 \cdot K_1 \cdot [R]}{1 + K_1 \cdot [R]} \quad 3.2$$

donde IE_o es la intensidad de emisión del tensioactivo libre e IE_1 es la intensidad de emisión del tensioactivo unido al receptor. IE representa la intensidad de emisión observada. n puede valer 1, 11 ó 19 y m vale 11 ó 19 (no puede darse los casos de los metalosurfactantes RuC11C19 y RuC19C11). $[R]$ es la concentración de receptor (ciclodextrinas en este trabajo) y K_1 es la constante de interacción entre el receptor y la sonda representado en la ecuación 3.2. Al ajustar los datos de intensidad de emisión obtenidos para los distintos tensioactivos en función de la concentración de receptor a la ecuación 3.2 no se obtuvieron buenos ajustes. Esto puede deberse a que este modelo sólo contempla la posibilidad de la formación de complejos 1:1. Así pues, se forman complejos de diferente estequiometría.

Se puede ampliar la ecuación 3.2 y obtener la ecuación 3.5 que tiene en cuenta los siguientes equilibrios:



$$IE = \frac{IE_o + IE_1 K_1 \cdot [R] + IE_2 K' [R]^2}{1 + K_1 \cdot [R] + K' [R]^2} \quad 3.5$$

donde IE_1 y IE_2 son las intensidades de los diferentes complejos de inclusión formados, IE la intensidad de emisión observada y $[R]$ la concentración de receptor. K_1 es la constante de interacción entre el receptor y la sonda para la formación del complejo de estequiometría 1:1 y K' es el producto K_1K_2 , siendo K_2 la constante de formación del complejo 1:2. Esta ecuación ajusta bien los valores de IE obtenidos para los tensioactivos de cadenas más corta, RuC1C11 y RuC11C11, pero no explica las tendencias obtenidas en el caso de tensioactivos con cadenas más largas, RuC1C19 y RuC19C19. En estos casos, una ampliación aún mayor de la ecuación 3.5 debe de realizarse, considerando la posibilidad de formación de complejos de tipo 1:3 (ver ecuación 3.9)³⁰ según los siguientes equilibrios:



$$IE = \frac{IE_o + IE_1K_1 \cdot [R] + IE_2K'[R]^2 + IE_3K''[R]^3}{1 + K_1 \cdot [R] + K'[R]^2 + K''[R]^3} \quad 3.9$$

Siendo IE_o la intensidad de emisión del tensioactivo libre; IE_1, IE_2 y IE_3 las intensidades de los complejos formados e IE la intensidad de emisión observada. $[R]$ es la concentración de receptor, K_1 es la constante de interacción entre el receptor y la sonda, K' es el producto K_1K_2 y K'' el producto $K_1K_2K_3$. En la Figura 3.5 se pueden observar los buenos ajustes obtenidos y en la Tabla 3.2 los datos de las constantes de interacción para los distintos tensioactivos con las α , β y γ -ciclodextrinas.

Tabla 3.2. Valores de las constantes de interacción para la formación de los complejos de inclusión con diferentes estequiometrías.

<i>Tensioactivo</i>	CD	IE ₁	IE ₂	IE ₃	K ₁ /(10 ⁵ mol·dm ⁻³)	K ₂ / mol·dm ⁻³	K ₃ / mol·dm ⁻³
RuC11C11	α	0.16±0.02	5.6±0.5	-----	24.2±0.3	26.2±0.8	-----
	β	0.25±0.01	2.0±0.3	-----	34±0.1	44.5±0.5	-----
	γ	0.23±0.02	1.9±0.1	-----	19.1±0.4	43.5±0.2	-----
RuC1C11	α	0.28±0.02	9.9±0.1	-----	14.2±0.5	50±10	-----
	β	0.36±0.02	2.9±0.2	-----	41±2	32±1	-----
	γ	0.35±0.01	2.4±0.1	-----	8.7±0.1	47±2	-----
RuC19C19	α	0.67±0.01	0.525±0.002	10.39±0.02	8.3±0.5	201±5	15±1
	β	0.59±0.07	2.72±0.01	18.02±0.05	16.7±0.3	59.7±1.7	8.2±0.1
	γ	0.64±0.01	0.88±0.05	8.47±0.03	7.97±0.08	125±3	8.0±0.8
RuC1C19	α	0.76±0.02	2.02±0.02	27.01±0.02	13.4±0.2	119±2	14.2±0.2
	β	0.66±0.01	0.41±0.03	25.7±0.2	1.02±0.06	1392±20	5.6±0.3
	γ	0.70±0.08	1.13±0.02	2.46±0.01	2.4±0.1	216±7	42±3

Según los resultados obtenidos, los tensioactivos de cadenas más cortas, once átomos de carbono, presentan una mayor constante de formación K₁, que corresponde a la formación de un complejo tensioactivo/ciclodextrina (en definitiva un [2]-pseudorrotaxano) de estequiometría 1:1. Con respecto al valor de la segunda constante de equilibrio observada, K₂ (correspondiente a la formación de complejos de inclusión 1:2 o también [3]-pseudorrotaxano) se aprecia que los valores son varios órdenes de magnitud más pequeños que los correspondientes a la primera constante.

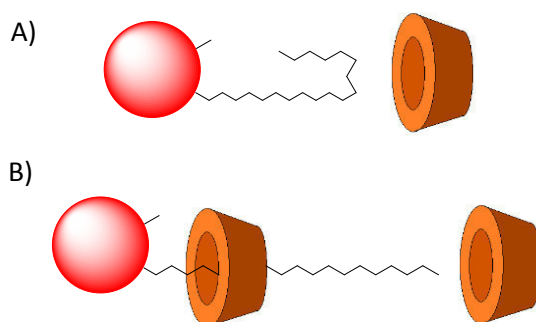
Cuando se analizan las constantes de interacción correspondientes a los tensioactivos de cadenas largas de 19 átomos de carbono, los valores de K₁ son del mismo orden de magnitud que los observados para los tensioactivos de cadenas más cortas. Por tanto, la constante de formación del [2]-pseudorrotaxano es prácticamente independiente de la longitud de la cadena hidrofóbica del metalosurfactante. En lo referente al valor de la segunda

contante, ésta es un orden de magnitud mayor para los metalosurfactantes de cadena larga. Esto indica que la formación del complejo [3]-pseudorrotaxano está más favorecida cuando aumenta la longitud de la cadena hidrofóbica.

La formación de complejos de inclusión 1:3, llamados [4]-pseudorrotaxanos, sólo se observó para los tensioactivos RuC1C19 y RuC19C19. Los valores de estas constantes de equilibrio son un orden de magnitud más pequeños que las constantes K_2 para los mismos metalosurfactantes, y del mismo orden de magnitud que las constantes K_2 que muestran los tensioactivos RuC1C11 y RuC11C11. En definitiva, los valores de las constantes de equilibrio correspondientes a la formación de los [n]-pseudorrotaxanos disminuyen conforme aumenta el número de especies que forman los complejos de inclusión debido, probablemente, a problemas de impedimento estérico.

Las ciclodextrinas utilizadas en este trabajo se diferencian en el número de unidades de glucopiranosas que contienen y, en consecuencia, en el tamaño de la cavidad interna del anillo que conforman. De hecho, el tamaño de dicha cavidad varía en el sentido $\alpha\text{-CD} < \beta\text{-CD} < \gamma\text{-CD}$.³¹ Se observó que la constante de equilibrio correspondiente a la formación del [2]-pseudorrotaxano, K_1 , es mayor en el caso de la $\beta\text{-CD}$ para todos los metalosurfactantes utilizados, excepto para el RuC1C19. Que la interacción con la $\beta\text{-CD}$ sea más fuerte indica que la formación de complejos de inclusión está energéticamente favorecida. Por tanto, es la $\beta\text{-CD}$ el mejor receptor de los estudiados para la mayoría de los metalosurfactantes. La excepción observada para el caso del RuC1C19 resulta un poco sorprendente. Sin embargo, el valor de K_2 correspondiente a la interacción RuC1C19/ $\beta\text{-CD}$ es más alta que para el resto de ciclodextrinas. Este comportamiento anómalo, al menos en principio, puede explicarse si se considera que la cadena alifática del tensioactivo RuC1C19, dada su baja afinidad por el agua, puede presentar una

determinada conformación plegada que impida la entrada de la molécula cíclica (ver Esquema 3.4. A). Una vez formado el [2]-pseudorrotaxano, la entrada de una segunda molécula de ciclodextrina podría verse favorecida (ver Esquema 3.4. B). Esto explicaría que el valor obtenido de la constante de interacción K_2 para el complejo [3]-pseudorrotaxano formado entre RuC1C19 y β -CD sea mayor que las obtenidas para cualquier otro anillo cíclico. Este comportamiento se podría dar en todos los casos, pero se aprecia de una forma más considerable en el caso de la interacción del RuC1C19 con β -CD.

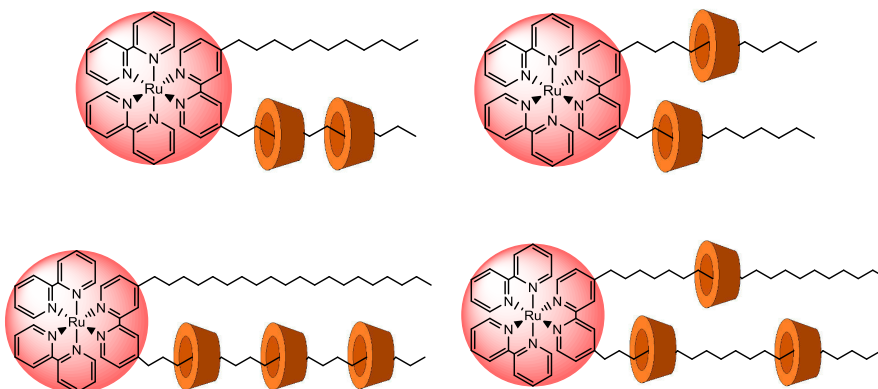


Esquema 3.4. Formación de un pseudorrotaxano para el caso del tensioactivo RuC1C19 con β -CD. A) entrada de una primera molécula de ciclodextrina en la cadena alifática del tensioactivo y formación del [2]-pseudorrotaxano y B) entrada de una segunda ciclodextrina para la formación del complejo [3]-pseudorrotaxano.

En definitiva, los resultados observados muestran que el tamaño de la ciclodextrina o, mejor dicho, de la cavidad de la ciclodextrina no es el único factor a tener en cuenta en la formación de los pseudorrotaxanos.

Está claro que, en el caso de los metalosurfactantes monocatenarios, las distintas moléculas de ciclodextrina se localizan en la misma cadena alifática cuando se forma el [3]-pseudorrotaxano. Y surge una pregunta para los metalosurfactantes de dos cadenas, ¿dónde se localizan las ciclodextrinas?,

es decir, ¿se encuentran las moléculas de CDs en la misma cadena o en distintas? (ver Esquema 3.5).



Esquema 3.5. Posibles localizaciones de los anillos de ciclodextrinas en las cadenas alifáticas de los metalosurfactantes.

Para concretar la localización de las ciclodextrinas en los metalosurfactantes de dos cadenas tenemos que comparar las constantes de equilibrio obtenidas para estos y las correspondientes para los tensioactivos de una cadena. Como se puede ver en la Tabla 3.2, los valores son muy parecidos entre sí. Esto nos indica que la dos ciclodextrinas para los tensioactivos de cadena corta, y las tres para los de cadena larga, se encuentran ubicadas en la misma cadena.

Aunque no se ha llevado a cabo ningún tipo de estudio para conocer la orientación del macrociclo en el complejo de inclusión, es conocido que las CDs poseen momentos dipolares: en el extremo más estrecho de la cavidad de la ciclodextrina está el polo positivo del momento dipolar y el negativo se encuentra en el extremo más ancho del anillo³². Por tanto, teniendo en cuenta la carga positiva de las cabezas polares de los tensioactivos, la orientación más probable de las moléculas de ciclodextrinas son las mostradas en el Esquema

3.4, con el extremo más ancho del toroide orientado hacia la cabeza polar del tensioactivo.

Para profundizar es el estudio de la formación de los diversos complejos de inclusión, se llevaron a cabo medidas de quenching (desactivación) de fluorescencia que dan información sobre la existencia de interacciones moleculares. La intensidad de fluorescencia que emite la cabeza hidrofílica de los tensioactivos sufre una desactivación en presencia de un quencher, el peroxodisulfato sódico. Se llevaron a cabo experiencias de quenching en presencia y ausencia de las diferentes ciclodextrinas. Para ello se midieron las intensidades de emisión de los distintos tensioactivos a distintas concentraciones de quencher ($S_2O_8^{2-}$) en ausencia y presencia de las distintas ciclodextrinas. Este proceso de desactivación es un quenching dinámico (transferencia de energía entre una especie excitada y una especie quencher) entre las especies $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ y $S_2O_8^{2-}$ ³³⁻³⁵, que se describe por la ecuación de Stern-Volmer³⁶ (ver ecuación 3.10):

$$\frac{IE_o}{IE} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_o [Q] \quad 3.10$$

donde K_{SV} representa la constante de equilibrio de Stern-Volmer, k_q la constante de velocidad bimolecular del proceso de quenching, τ_o el tiempo de vida del fluoróforo, es decir los metalosurfactantes en este trabajo, en ausencia de quencher y $[Q]$ la concentración de quencher en la disolución. Según esta expresión, si tiene lugar un quenching de tipo dinámico entre los tensioactivos y el quencher, se debería de obtener una dependencia lineal en la representación de IE_o/IE frente a la $[Q]$. Sin embargo, una dependencia lineal también se observa cuando entre el fluoróforo y el quencher tiene lugar un proceso de quenching estático (producido como consecuencia de la formación de un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y la molécula quencher).

Un proceso de quenching estático conduce a la siguiente relación de Stern-Volmer:

$$\frac{IE_o}{IE} = 1 + K_S [Q] \quad 3.11$$

en la que K_S es la constante de formación del complejo no fluorescente formado entre el fluoróforo (F) y el quencher (Q), definido como:

$$K_S = \frac{[F - Q]}{[F][Q]} \quad 3.12$$

La Figura 3.6 muestra la dependencia observada para RuC11C11 en presencia de α -CD a distintas concentraciones de ésta (se llevaron a cabo medidas de quenching a concentraciones de ciclodextrina que coinciden con las distintas tendencias observadas en la Figura 3.5, bajada, constancia y aumento de la IE). Se observaron desviaciones negativas de la ecuación de Stern-Volmer, que habían sido observadas anteriormente para otros sistemas.^{37,38} Este tipo de comportamiento suele deberse a la existencia de distintos estados de fluorescencia o a la formación de nuevos compuestos. En este caso, tales desviaciones podrían indicar la presencia en el medio de pseudorrotaxanos con diferentes estequiometrias, como se mencionó anteriormente. Así, a concentraciones bajas de ciclodextrinas, cuando sólo se han formado [2]-pseudorrotaxanos, se observan representaciones lineales de la ecuación de Stern-Volmer (ver Figura 3.6. A). Al aumentar la concentración de ciclodextrina se encuentra en el medio una mezcla de [2]- y [3]-pseudorrotaxanos y, por tanto, se observan desviaciones de la ecuación de Stern-Volmer. La adición de más cantidad de ciclodextrina al medio provoca la curvatura de dicha ecuación (ver Figura 3.6. B) hasta que, a las concentraciones mayores de CD, solo la especie [3]-pseudorrotaxano se

encuentra presente en el medio y se vuelven a observar representaciones lineales de Stern-Volmer (ver Figura 3.6. C).

En el caso de los metalosurfactantes de cadenas larga, RuC1C19 y RuC19C19, se realizó un estudio análogo al realizado para los tensioactivos de cadena corta (ver Figura 3.7.). Los resultados que se obtuvieron fueron totalmente similares. En consecuencia, la formación de diversas clases de pseudorrotaxanos explican las desviaciones negativas observadas en la ecuación de Stern-Volmer.

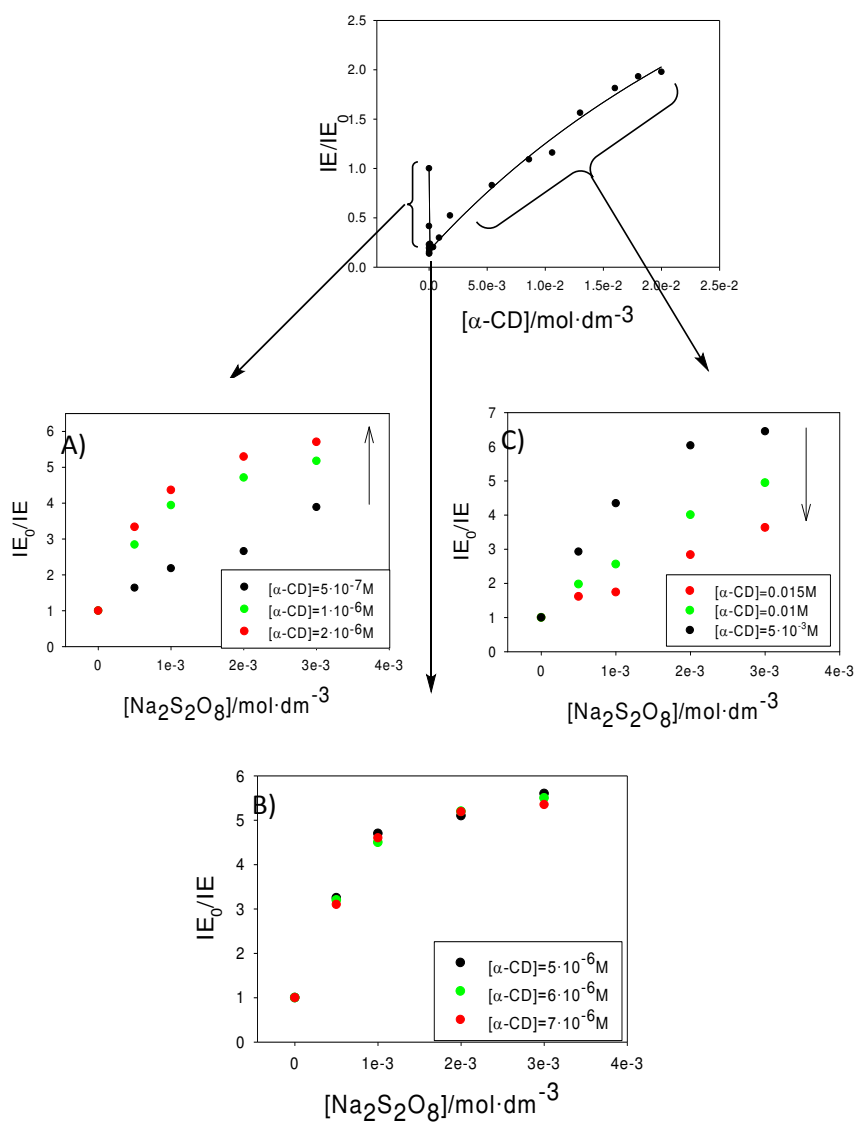


Figura 3.6. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para el tensioactivo RuC11C11 en presencia de α -CD a distintas concentraciones del anillo. A) zona de bajada de IE, B) zona constante de IE y C) zona de aumento de la IE.

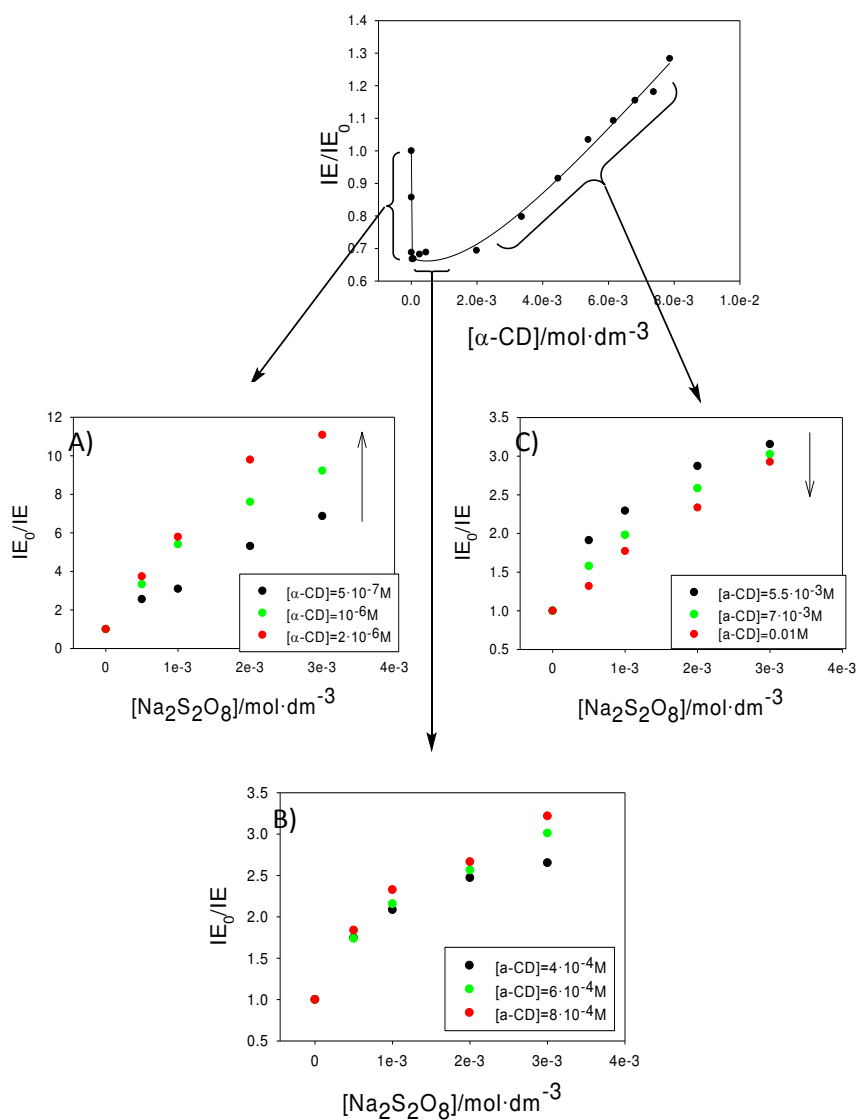


Figura 3.7. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para el tensioactivo RuC19C19 en presencia de α-CD a distintas concentraciones del anillo. A) zona de bajada de IE, B) zona constante de IE y C) zona de aumento de la IE.

3.3 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Los metalosurfactantes RuC1C11, RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19 y las α -, B- y γ -ciclodextrinas forman complejos de inclusión, llamados pseudorrotaxanos. La interacción que tiene lugar entre los tensioactivos y las ciclodextrinas se produce a través de la inclusión de las cadenas alifáticas en la cavidad de los anillos de las CD.

2. La longitud de las cadenas alifáticas de los tensioactivos influye en el tipo de complejo de inclusión formado: se forman los complejos [2]- y [3]-pseudorrotaxanos para los tensioactivos de cadenas cortas, RuC1C11 y RuC11C11; mientras que para los metalosurfactantes de cadenas larga, RuC1C19 y RuC19C19, además de estos dos complejos también se forma la especie [4]-pseudorrotaxano. Por el contrario, el número de cadenas alifáticas que contiene el tensioactivo no influye en el tipo de pseudorrotaxano formado para cada uno de ellos.

3. En el caso de los tensioactivos bicatenarios, las distintas moléculas de ciclodextrina se localizan en la misma cadena alifática. Esto probablemente es debido a problemas de tipo estérico.

3.4 Bibliografía

- (1) Erbas-Cakmak, S.; Leigh, D. A.; McTernan, C. T.; Nussbaumer, A. L. Artificial Molecular Machines. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (18), 10081–10206.
- (2) Balzani, V.; Gómez-López, M.; Stoddart, J. F. Molecular Machines. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 405–414.
- (3) Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Artificial Molecular Machines*; 2000; Vol. 39.
- (4) Walker, J. E. ATP Synthesis by Rotary Catalysis. *Angew. Chem. Int.* **1998**, *37*, 2308–2319.
- (5) Seoane, S.; Díaz-Rodríguez, P.; Sendon-Lago, J.; Gallego, R.; Pérez-Fernández, R.; Landin, M. Administration of the Optimized β -Lapachone-Poloxamer-Cyclodextrin Ternary System Induces Apoptosis, DNA Damage and Reduces Tumor Growth in a Human Breast Adenocarcinoma Xenograft Mouse Model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84* (3), 497–504.
- (6) Rastegari, B.; Karbalaee-Heidari, H. R.; Zeinali, S.; Sheardown, H. The Enzyme-Sensitive Release of Prodigiosin Grafted β -Cyclodextrin and Chitosan Magnetic Nanoparticles as an Anticancer Drug Delivery System: Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *158*, 589–601.
- (7) Yilmaz, B.; Aydin, N.; Bayrakci, M. Pesticide Binding and Urea-Induced Controlled Release Applications with Calixarene Naphthalimide Molecules by Host–guest Complexation. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* **2018**, *0* (0), 1–8.
- (8) Gotoh, K.; Kunimitsu, S.; Zhang, H.; Lerner, M. M.; Miyakubo, K.; Ueda, T.; Kim, H. J.; Han, Y. K.; Ishida, H. Structure and Dynamic Behavior of the Na-Crown Ether Complex in the Graphite Layers Studied by DFT and ^1H NMR. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (20), 10963–10970.
- (9) Dey, J.; Roberts, E. L.; Warner, I. M. Effect of Sodium Perchlorate on the Binding of 2- (4 ' -Aminophenyl) - and 2- (4 ' - (N , N ' -Dimethylamino) Phenyl) Benzothiazole with -Cyclodextrin in Aqueous Solution. *Society* **1998**, *5639*, 301–305.
- (10) Liu, Y.; Guo, D. S.; Zhang, H. Y.; Ma, Y. H.; Yang, E. C. The Structure and

- Thermodynamics of Calix[n]arene Complexes with Dipyridines and Phenanthroline in Aqueous Solution Studied by Microcalorimetry and NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (7), 3428–3434.
- (11) Mustafina, A. R.; Skripacheva, V. V.; Gubskaya, V. P.; Gruner, M.; Solv'eva, S. E.; Antipin, I. S.; Kazakova, E. K.; Konovalov, A. I.; Habicher, W. D. Outer-Sphere Interactions between Octahedral Chiral cobalt(III) Complexes and Water-Soluble Calixarenes. *Russ. Chem. Bull.* **2004**, *53* (7), 1511–1519.
- (12) Dalgarno, S. J.; Hardie, M. J.; Atwood, J. L.; Warren, J. E.; Raston, C. L. A Complex 3D “wavy Brick Wall” Coordination Polymer Based on P-sulfonatocalix[8]arene. *New J. Chem.* **2005**, *29* (5), 649.
- (13) Schneider, V. H. Mechanismen Der Molekularen Erkennung - Untersuchungen an Organischen Wirt-Gast-Komplexen. *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1419–1439.
- (14) Kuhnert, N.; Tang, B. Synthesis of Diastereomeric Trianglamine- β -Cyclodextrin-[2]-Catenanes. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (17), 2985–2988.
- (15) Niu, Z.; Gibson, H. W. Polycatenanes. *Chem. Rev* **2009**, *109*, 6024–6046.
- (16) Wenz, G.; Han, B. H.; Müller, A. Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 782–817.
- (17) Zhou, J.; Ritter, H. Cyclodextrin Functionalized Polymers as Drug Delivery Systems. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1552–1559.
- (18) Valente, A. J. M.; Söderman, O. The Formation of Host-Guest Complexes between Surfactants and Cyclodextrins. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *205*, 156–176.
- (19) Weiss-Errico, M. J.; O'Shea, K. E. Detailed NMR Investigation of Cyclodextrin-Perfluorinated Surfactant Interactions in Aqueous Media. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *329*, 57–65.
- (20) Hänni, K. D.; Leigh, D. A. The Application of CuAAC “Click” Chemistry to Catenane and Rotaxane Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1240–1251.
- (21) Martín, V. I.; Angulo, M.; López-Cornejo, P.; López-López, M.; Marchena, M. J.; Moyá, M. L. Stoppering/unstoppering of a Rotaxane Formed between an N-Heterocycle Ligand Containing Surfactant: β -Cyclodextrin Pseudorotaxane and pentacyanoferrate(II) Ions. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *497*, 343–349.

- (22) Taira, T.; Suzuki, Y.; Osakada, K. PdII and PtII complexes with Amphiphilic Ligands: Formation of Micelles and [5]rotaxanes with α -Cyclodextrin in Aqueous Solution. *Chem. - An Asian J.* **2008**, *3*, 895–902.
- (23) Kostova, I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (9), 1085–1107.
- (24) Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; von Zelewsky, A. Ru(II) Polypyridine Complexes: Photophysics, Photochemistry, Electrochemistry, and Chemiluminescence. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 85–277.
- (25) Kalyanasundaram, K. Photophysics, Photochemistry and Solar Energy Conversion with tris(bipyridyl)ruthenium(II) and Its Analogues. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *46* (C), 159–244.
- (26) Valenty, S. J.; Behnken, D. E.; Gaines, G. L. Preparation and Monolayer Properties of Surfactant Tris(2, 2'-bipyridine)ruthenium(II) Derivatives. *Inorg. Chem.* **1979**, *18* (8), 2160–2164.
- (27) Maibaum, L.; Dinner, A. R.; Chandler, D. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. **2004**, *108*, 6778–6781.
- (28) Tsianou, M.; Fajalia, A. I. Cyclodextrins and Surfactants in Aqueous Solution above the Critical Micelle Concentration: Where Are the Cyclodextrins Located? *Langmuir* **2014**, *30* (46), 13754–13764.
- (29) Kawaguchi, Y.; Nishiyama, T.; Okada, M.; Kamachi, M.; Harada, A. Complex Formation of Poly(ϵ -Caprolactone) with Cyclodextrins. *Macromolecules* **2000**, *33* (12), 4472–4477.
- (30) Shen, X. H.; Belletete, M.; Durocher, G. Spectral and Photophysical Studies of the 1 : 3 (Guest/host) Rotaxane-like Inclusion Complex Formed by a 3H-Indole and Beta-Cyclodextrin. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (11), 1877–1883.
- (31) Bekers, O.; Uijtendaal, E. V.; Beijnen, J. H.; Bult, A.; Underberg, W. J. M. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1991**, *17* (11), 1503–1549.
- (32) Liu, L.; Guo, Q. X. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom.* **2002**, *42* (1–2), 1–14.
- (33) López-Cornejo, P.; Sánchez, F. Micellar Effects on the Kinetics of the Oxidation of the

- Excited State of the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ Complex by $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. A Comparison of Different Approaches for the Interpretation of Micellar Effects on Kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (43), 10523–10527.
- (34) Lopes-Costa, T.; Lopez-Cornejo, P.; Villa, I.; Perez-Tejeda, P.; Prado-Gotor, R.; Sanchez, F. Salt and Solvent Effects on the Kinetics of the Oxidation of the Excited State of the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ Complex by $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (12), 4196–4201.
- (35) Lopes-Costa, T.; Sanchez, F.; Lopez-Cornejo, P. Cooperative and Noncooperative Binding of $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ to DNA and SB4 . 5G Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9373–9378.
- (36) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin/C.; 1978.
- (37) Keizer, J. Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin of Positive Curvature in Stern-Volmer Plots. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (6), 1494–1498.
- (38) Htun, T. A Negative Deviation from Stern-Volmer Equation in Fluorescence Quenching. *J. Fluoresc.* **2004**, *14* (2), 217–222.

Capítulo 4º.

Monómeros de
metalosurfactantes y su
interacción con ADN

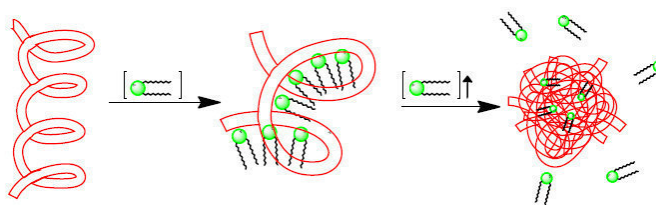
El ácido desoxirribonucleico, ADN, fue descubierto por Friedrich Miescher en 1869 cuando intentaba obtener núcleos mezclando glóbulos blancos, obtenidos de la pus de vendas quirúrgicas desechadas, con ácido clorhídrico¹. En 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty demostraron que esta molécula contenía toda la información genética; y en 1953 James D. Watson y Francis H.C. Crick, basándose en los datos de difracción de rayos X obtenidos por Rosalind Franklin, propusieron un modelo de estructura del ADN que consiste en la existencia de una doble hélice. La estructura propuesta por Watson y Crick es conocida hoy como la conformación B del ADN, o simplemente B-ADN; y es la conformación más estable de este polinucleótido bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, también existen otras formas de encontrar el ADN en la naturaleza. Entre ellas, las más comunes son las formas A-ADN y Z-ADN² (descritas en la introducción de esta tesis).

Indistintamente de la conformación que presente el polinucleótido, ésta estructura puede verse modificada tanto por las condiciones del medio como por la presencia en él de diferentes especies moleculares tales como alcoholes^{3,4}, iones multivalentes⁵⁻⁷, polipéptidos cargados positivamente⁸⁻¹⁰, histonas^{11,12}, poliaminas¹³, nanopartículas¹⁴⁻¹⁶ o complejos metálicos^{17,18}.

En la naturaleza, el ADN genómico es una molécula de gran longitud que se haya encapsulada dentro de una célula o virus. El proceso en el que una cadena larga de ADN se transforma en una estructura más pequeña se denomina condensación o compactación. Este fenómeno de compactación de las moléculas de ADN lleva asociado un gasto energético debido a:

- i) la pérdida de entropía configuracional que lleva asociado el cambio conformacional,
- ii) la flexión de la doble hélice,
- iii) y las repulsiones electrostáticas existentes entre las cargas negativas de los grupos fosfatos que posee la cadena de ADN,¹⁹

Para que el proceso de condensación tenga lugar, el organismo debe emplear una energía metabólica considerable²⁰. En el laboratorio se ha observado que el ADN sufre un proceso de condensación tras la adición de especies tales como iones de alta carga o tensioactivos catiónicos²⁰⁻²². Tras estudios realizados durante décadas, se ha demostrado que la adición de monómeros de tensioactivos catiónicos a una disolución de ADN provoca un cambio conformacional en el polinucleótido que va desde un estado de doble hélice alargada (un estado de bobina extendida) a otro estado más compacto formado por glóbulos (ovillos), como se muestra en el Esquema 4.1.



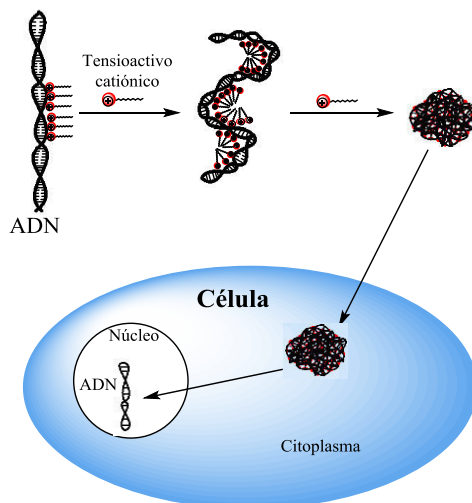
Esquema 4.1. Cambio conformacional del polinucleótido en presencia de monómeros de un tensioactivo catiónico.

El mecanismo a través del cual ocurre el proceso de compactación de un polinucleótido no está totalmente claro. Se sabe que el cambio en la estructura del polinucleótido en presencia de tensioactivos catiónicos tiene lugar por la acción de dos tipos de interacciones: i) interacciones electrostáticas entre las cabezas hidrofílicas del tensioactivo cargadas positivamente y los grupos fosfatos de las bases del ADN que poseen carga negativa e ii) interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas del tensioactivo, que forma hemimicelas en la superficie del ADN. Este mecanismo se describió anteriormente en esta memoria.

En la bibliografía se encuentran muchos estudios de compactación, y algunos menos sobre la decompactación del ADN. Así, por ejemplo, Lu Xu y colaboradores²³ realizaron un estudio en el que describieron la compactación

del polinucleotido empleando diferentes tensioactivos catiónicos. Entre los resultados obtenidos, cabe resaltar la importancia que presenta el contraion de los distintos tensioactivos utilizados como agentes de condensación. En el estudio de Xiaoyan Li y colaboradores,²⁴ se proponen dos mecanismos distintos que explican el proceso de compactación del polinucleotido con el tensioactivo CTAB. Todos los mecanismos descritos muestran una dependencia con la longitud del ADN. Concluyen que la compactación de fragmentos de ADN pequeños está principalmente inducida por la agregación de moléculas de monómero en la superficie, mientras que para fragmentos grandes son agregados micelares de este tensioactivo los responsables de la compactación del polinucleotido.

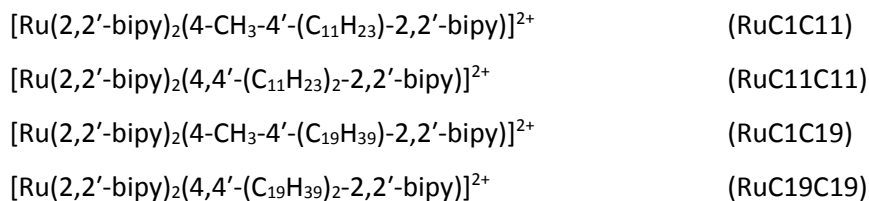
Los estudios de compactación del ADN han ganado importancia en los últimos años debido, especialmente, a su uso en tratamientos de terapia génica en el campo de la biomedicina. La terapia génica, que consiste en la inserción de genes funcionales ausentes en el genoma de un individuo, se realiza en las células o tejidos con el objetivo de tratar enfermedades tanto genéticas como adquiridas. Aunque aún la entrega efectiva de los genes terapéuticos en las células diana *in vitro* e *in vivo* (ver Esquema 4.2) sigue siendo uno de los mayores retos para los investigadores en el estudio de la terapia génica²⁵.



Esquema 4.2. Diferentes etapas involucradas en un proceso de terapia génica empleando tensioactivos como vectores.

En este capítulo nuestro principal propósito consistirá en evaluar la formación de complejos tensioactivo/ADN. Para ello se determinarán las constantes de formación de estos agregados. Además, se pretende estudiar el efecto que ejerce la presencia de monómeros en la conformación del ADN, así como evaluar la importancia que tienen las interacciones hidrofóbicas en estos cambios conformacionales y cómo se pueden modificar estas interacciones.

El ADN que se ha empleado en la realización de estos estudios es de timo de ternera. Los tensioactivos que se van a emplear son los cuatro metalosurfactantes derivados del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$:



4.1 Experimental.

Todas las experiencias se realizaron a un valor constante de pH=7 (tampón de cacodilato/NaCl, I= 0.01 mol·dm⁻³) y a una temperatura de 298.0 ± 0.1 K

4.1.1 Medidas de fluorescencia.

4.1.1.1. Las medidas de fluorescencia se realizaron a distintas concentraciones de bromuro de etidio (EB) y ADN:

1.- [EB] = 3.00·10⁻⁶ mol·dm⁻³ y [ADN] = 2.00·10⁻⁷ mol·dm⁻³ para RuC11C11 y RuC19C19.

2.- [EB] = 1,35·10⁻⁶ mol·dm⁻³ y [ADN] = 9.00·10⁻⁸ mol·dm⁻³ para RuC1C11 y RuC1C19.

Las concentraciones de surfactante se variaron con el fin de estudiar el intervalo de valores de relación molar X deseado ($X = [\text{surfactante}]/[\text{DNA}]$). Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 500 nm y 590 nm, respectivamente. Se utilizó una longitud de onda de excitación mayor que la presentada por el bromuro de etidio (480 nm) con el fin de evitar posibles interferencias en la emisión.

4.1.1.2. Las titulaciones de fluorescencia se realizaron usando la cabeza hidrofílica del tensioactivo, el complejo de rutenio (II), como sonda (sin la necesidad de añadir EtBr, o cualquier otra especie fluorescente, a la disolución). Se usó una concentración fija de tensioactivo de 4.50·10⁻⁷ mol·dm⁻³ para los de cadenas más corta, y 2.00·10⁻⁷ mol·dm⁻³ para los de cadena larga (en todos los casos las concentraciones de las moléculas anfipáticas utilizadas son inferiores al valor de CMC de cada uno de ellos, con el fin de evitar la presencia de agregados micelares en las disoluciones). Se utilizaron distintas

concentraciones de ADN, cuyos valores variaron de $5.00 \cdot 10^{-8}$ a $2.10 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC11C11, de $3.20 \cdot 10^{-8}$ a $2.00 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC1C11, de $1.00 \cdot 10^{-7}$ a $3.00 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC19C19 y de $2.50 \cdot 10^{-8}$ a $6.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC1C19; con el fin de estudiar todo el rango de valores de X deseado. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 456 nm y 602 nm, respectivamente, para las especies RuC11C11, RuC19C19 y RuC1C19; y 457 nm y 602 nm, respectivamente, para la especie RuC1C11.

4.1.1.3. Para estudiar la influencia que ejercen las moléculas macrocíclicas de ciclodextrinas en el sistema tensioactivo/ADN, se utilizaron diferentes concentraciones de ciclodextrina dentro del rango de $1.00 \cdot 10^{-6}$ a $2.50 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Para las medidas de desactivación de fluorescencia (quenching), la concentración del desactivador de fluorescencia ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) se varió de 0 a $3.00 \cdot 10^{-3}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4.1.2 Medidas de dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se registraron en un rango de longitudes de onda de 220 a 400 nm. Cada espectro resultante es el promedio de 10 barridos a una temperatura fija de 298.2 K, dejando un tiempo 5 minutos entre barridos. Los espectros se realizaron a concentraciones fijas de ADN y EB, utilizando la cantidad de tensioactivo de rutenio necesaria para obtener las relaciones molares de X apropiadas. Las concentraciones utilizadas fueron:

- i) $[\text{EB}] = 9.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $[\text{ADN}] = 2.50 \times 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC11C11.
- ii) $[\text{EB}] = 9.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $[\text{ADN}] = 3.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC1C11.
- iii) $[\text{EB}] = 9.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $[\text{ADN}] = 2.70 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC19C19.
- iv) $[\text{EB}] = 9.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $[\text{ADN}] = 3.00 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para RuC1C19.

4.1.3 Imágenes topográficas de microscopia de fuerza atómica.

Con el fin de obtener imágenes de las moléculas de ADN aisladas, fue necesario utilizar disoluciones diluidas ($0.30 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) debido al gran tamaño de estas moléculas. La preparación de las muestras se realizó siguiendo lo descrito en la sección de Material y Método del Capítulo 2 de esta tesis.

4.1.4 Imágenes de microscopía confocal.

Las medidas se llevaron a cabo a concentración fija de monómeros de metalosurfactantes, $2.50 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Se utilizaron distintas concentraciones de ADN, en el intervalo $3.12 \cdot 10^{-6}$ - $6.25 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, con el fin de obtener los valores de la relación molar X deseado. De las disoluciones preparadas se depositan 100 μL en el porta muestras.

4.2 Resultados y discusión.

Como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de este capítulo, la estructura que presenta el ADN en condiciones fisiológicas es la conocida B-ADN, una conformación de doble hélice extendida. Esta conformación puede cambiar cuando se añaden a la disolución especies tales como tensioactivos catiónicos. Este cambio conformacional depende de diversos factores. Según el sistema y las condiciones de trabajo, el cambio ocurre a una determinada relación de concentraciones tensioactivo/ADN (ecuación 4.1), donde:

$$X = \frac{[\textit{tensioactivo}]}{[\textit{ADN}]} \quad 4.1$$

La interacción de tensioactivos catiónicos con ADN ha sido muy estudiada en la última década. Una de las técnicas más utilizadas consiste en la realización de medidas de intensidad de emisión de una especie fluorescente. Uno de los fluoróforos más utilizados es el bromuro de etidio (EtBr). Esta sonda es una molécula plana que se intercala con facilidad entre los pares de bases nitrogenados de la doble hélice del ADN, y que presenta la siguiente característica: la intensidad de emisión de dicha especie es mucho mayor cuando se encuentra en una posición de intercalación entre los pares de bases nitrogenados, que cuando se encuentra libre en disolución. Las moléculas de agua (disolvente) en disolución son las responsables de la baja emisión que muestra el EtBr, ya que estas moléculas interactúan con las de EtBr generando un efecto quenching en la emisión del bromuro de etidio. Este comportamiento no se observa cuando se encuentra intercalado debido al entorno apolar que crean las bases del ADN^{26,27}.

Las longitudes de onda a las que aparecen máximos de excitación del EtBr y de los metalosurfactantes son 480 nm y 456 nm, respectivamente. Con el fin de evitar el solapamiento de bandas y evitar las interferencias producidas por la posible emisión de los tensioactivos, las medidas se realizaron a una longitud de onda de excitación para el EtBr de 500 nm. De esta forma se evitan, o se minimizan, errores en la interpretación de los resultados obtenidos. Estos resultados se recogen en la siguiente figura (ver Figura 4.1.), donde se representa la relación $IE/[tensioactivo]$ (IE: intensidad de emisión) frente a la relación de concentraciones X.

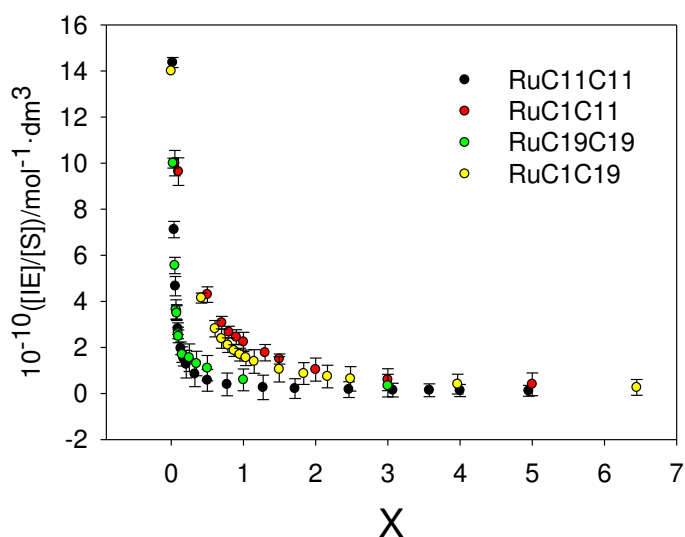


Figura 4.1. Variación de la intensidad de emisión del bromuro de etidio relativa a la concentración de tensioactivo con el valor de X para los distintos tensioactivos sintetizados.

En todos los casos se observa una disminución de la intensidad de emisión de la especie fluorescente EtBr al aumentar el valor de X, alcanzándose un valor de intensidad de emisión constante a valores altos de la relación molar X, independiente del tensioactivo utilizado. Este comportamiento en el valor de la intensidad de emisión indica que el EtBr es desplazado desde su posición de intercalación entre los pares de bases del ADN hacia un estado más hidrofílico, la disolución, conforme aumenta la cantidad de tensioactivo añadido al medio. Comportamientos similares del ADN han sido observados en presencia de otros tensioactivos catiónicos, relacionándose en todos los casos con posibles cambios conformacionales sufridos por el polinucleótido en presencia de dichas moléculas anfifílicas²⁸.

La tendencia de la intensidad de emisión observada se explica de la siguiente forma. Inicialmente, a valores pequeños de X, hay pocas moléculas de tensioactivo en el medio, que interaccionarán electrostáticamente con los

grupos fosfatos del ácido nucleico. En esta situación, las moléculas de bromuro de etidio, intercaladas entre los pares de base nitrogenados, no sufrirán modificación alguna y mostrará una alta intensidad de emisión cuando es excitada. Al irse adicionando tensioactivo al medio, más moléculas de tensioactivo interaccionarán con el ADN y se empezarán a formar hemimicelas en la superficie del polinucleótido. Esto provocará cambios conformacionales que aumentarán conforme aumenta la cantidad de tensioactivo añadida. Estos cambios en la conformación del polinucleótido, provocan desplazamientos de las moléculas de bromuro de etidio desde su posición de intercalación hacia el seno de la disolución, que posee un carácter más polar. Como resultado la intensidad de emisión de la sonda disminuye hasta alcanzar un valor mínimo (situación en la cual todo el EtBr se encontrará en la disolución).

Al analizar las diferencias entre los distintos tensioactivos podemos observar que los tensioactivos que poseen dos cadenas alifáticas provocan el cambio conformacional del ADN a valores de X más bajos, es decir, se requiere una concentración de tensioactivo menor para que se produzca el desplazamiento total de la sonda empleada. Este comportamiento está relacionado con los efectos hidrofóbicos mencionados anteriormente. Al aumentar el número de cadenas alifáticas en el tensioactivo aumentan los efectos hidrofóbicos y, en consecuencia, el ADN sufre un cambio conformacional a concentraciones de tensioactivo menores. Este resultado demuestra la importancia que presenta el carácter hidrofóbico de las moléculas anfipáticas en el efecto que produce su presencia en la conformación del ácido nucleico.

El dicroísmo circular puede proporcionar información sobre cambios en la conformación del ácido nucleico al adicionar a la disolución otras especies que la puedan alterar. Las concentraciones de polinucleótido utilizadas en los estudios realizados se encuentran por debajo del límite de detección del

equipo. En un principio, este hecho no permite la obtención de resultados concluyentes mediante el uso de esta técnica. Sin embargo, el hecho de que el bromuro de etidio muestre una banda de dicroísmo característica a 308 nm cuando se encuentra intercalado entre los pares de bases del ADN²⁹ y que la intensidad de esta banda disminuye cuando se desplaza la sonda hacia el seno de la disolución ha permitido utilizar esta técnica en el presente estudio. Se observa una disminución de la elipticidad cuando aumenta X (ver Figura 4.2), lo que está de acuerdo con los resultados de fluorescencia e indica que la interacción de los monómeros de tensioactivo con el ADN provoca un cambio en la posición del EtBr, desde la posición de intercalación entre los pares de base hacia el seno de la disolución.

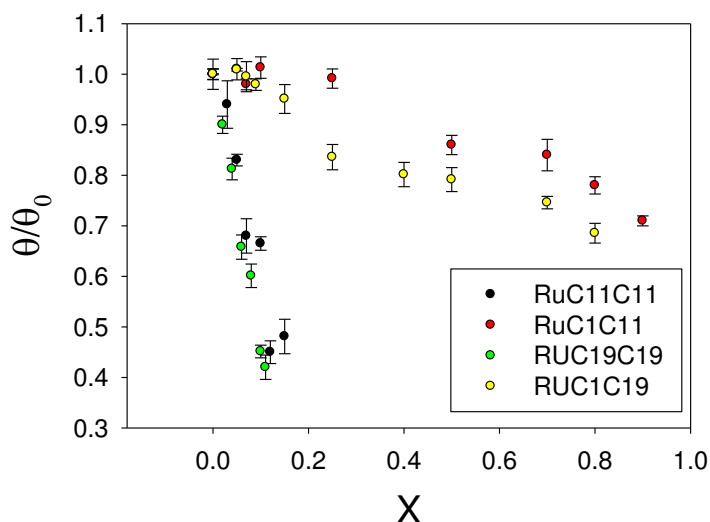


Figura 4.2. Dependencia de la elipticidad molar relativa de EB ($\lambda = 309$ nm) con la relación molar X.

El siguiente objetivo fue cuantificar la interacción monómeros-ADN. Para ello se llevaron a cabo medidas de intensidad de fluorescencia de los monómeros de RuC11C11, RuC1C11, RuC19C19 y RuC1C19, que son especies fluorescentes por sí mismas, en presencia de distintas cantidades de ADN (ver

Figura 4.3.). Los resultados mostraron dos tendencias claras. Inicialmente se observa una disminución de la intensidad de emisión al aumentar el valor de la relación molar X , hasta alcanzar un valor mínimo. Una adición posterior de tensioactivo resulta en un aumento de la intensidad de la banda (ver Figura 4.3. A y B). El mismo comportamiento se observó para los cuatro tensioactivos sintetizados.

Esta variación de la intensidad de emisión se muestra, de una forma más clara, al representar el valor del máximo de intensidad (obtenida para un valor de longitud de onda de 602 nm) frente a la relación molar X (ver Figura 4.4). En esta figura se observa que conforme aumenta X , para los valores más pequeños de esta relación de concentraciones, la intensidad de emisión disminuye bruscamente hasta unos valores de X aproximadamente igual a 0.24 para RuC11C11, 1.24 para RuC1C11, 0.16 para RuC19C19 y 0.91 para RuC1C19. Una vez superados estos valores de relación molar, se observa que la intensidad de emisión aumenta conforme aumenta la cantidad de monómero añadida al medio (a concentración de polinucleótido constante).

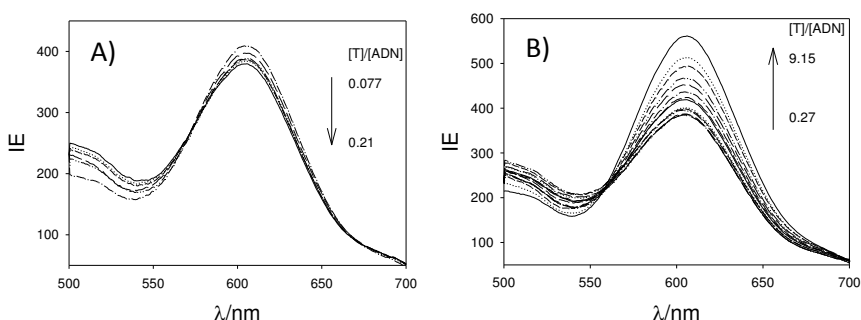


Figura 4.3. Espectro de fluorescencia del complejo tensioactivo/ADN a diferentes valores de X .

Este comportamiento se puede explicar si se supone que los monómeros de tensioactivo libre en disolución presentan una intensidad de emisión mayor que cuando está formando el complejo tensioactivo/ADN y

considerando el *carácter cooperativo* de la interacción de las moléculas de tensioactivo con el polinucleótido. Así, cuando la concentración de tensioactivo es pequeña respecto a la de ADN (es decir, a valores pequeños de X), las cabezas positivas del tensioactivo interaccionan electrostáticamente con los grupos fosfato aniónicos que forman parte de la estructura del ácido nucleico. El carácter cooperativo de esta interacción significa que la unión de un segundo complejo de rutenio a una misma molécula de ADN está favorecida como consecuencia de la unión de la primera molécula (explicado en la introducción apartado 1.6). Por tanto, para valores pequeños de X , al aumentar la relación $[\text{tensioactivo}]/[\text{ADN}]$ el sistema se caracteriza por tener cada vez más moléculas de tensioactivo unidas al polinucleótido, observándose una disminución de la intensidad de emisión. Este proceso de disminución de intensidad ocurre hasta que el polinucleótido se *satura* de moléculas de tensioactivo, formándose el complejo tensioactivo/ADN²⁸, que ocurre en nuestras condiciones de trabajo a los valores de X mencionados anteriormente (X_c). La adición de más cantidad de moléculas anfifílicas al sistema resulta en un aumento del tensioactivo libre en la disolución, lo que hace aumentar el valor de intensidad de emisión promedia del sistema.

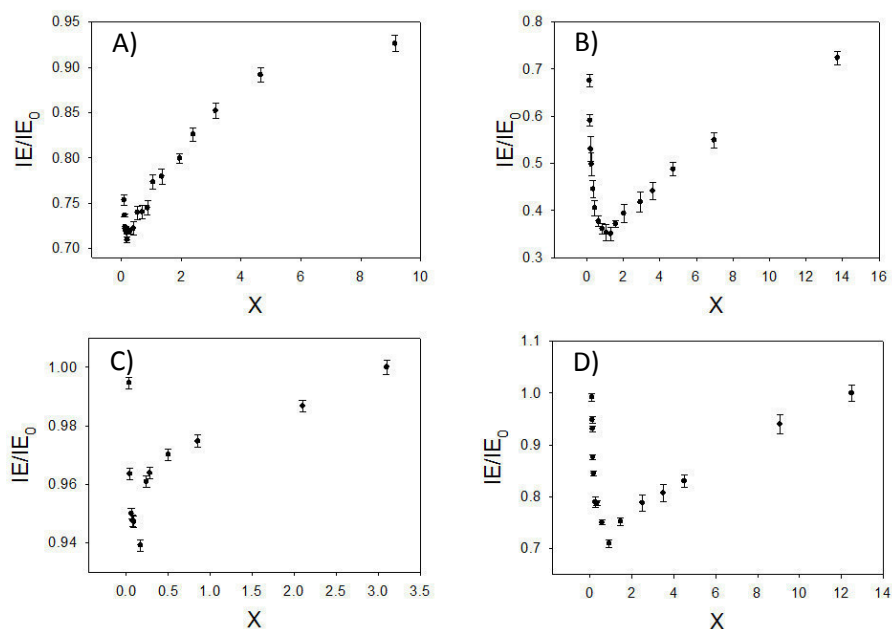


Figura 4.4. Evolución de la intensidad de emisión relativa del tensioactivo a diferentes valores de X. A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.

Con el fin de cuantificar el proceso de interacción entre los metalosurfactantes preparados y el ADN, se realizó un análisis cuantitativo de los resultados obtenidos. Para ello se define la constante de interacción correspondiente al equilibrio:



como se indica a continuación:

$$K_b = \frac{[T/ADN]}{[T_l] \cdot [ADN_l]} \quad 4.3$$

donde $[T_l]$ y $[ADN_l]$ son las concentraciones de tensioactivo y ADN libres, respectivamente, y $[T/ADN]$ es la concentración del complejo formado. Todas

las concentraciones están referidas al volumen total de la disolución. Los valores de K_b para cada concentración de ADN se pueden determinar a partir de los valores obtenidos de intensidad de emisión (IE), utilizando un modelo de dos estados³⁰. Sobre esta base, se puede escribir la siguiente ecuación:

$$IE = \frac{IE_W + IE_{ADN}K_b[ADN_l]}{1 + K_b[ADN_l]} \quad 4.4$$

donde IE_w e IE_{ADN} son las intensidades de emisión del tensioactivo libre y de tensioactivo unido al ADN, respectivamente.

A partir de la concentración de ADN total se puede relacionar ésta con la concentración de ADN libre con la siguiente expresión:

$$[ADN_l] = [ADN_T] - [T/ADN] \quad 4.5$$

La concentración de ADN libre se puede calcular empleando las ecuaciones 4.5-4.8.

$$IE = \frac{IE_W[T]_w + IE_{ADN}[T/ADN]}{[T]_0} \quad 4.6$$

$$IE = IE_w(100 - f_{T/ADN}) + IE_{ADN} \cdot f_{T/ADN} \quad 4.7$$

$$[T/ADN] = [T]_0 \cdot f_{T/ADN} \quad 4.8$$

donde $[T]_0$ es la concentración total de tensioactivo (igual a la concentración de tensioactivo inicial) y $f_{T/ADN}$ es la fracción (en porcentaje) de tensioactivo que interacciona con el polinucleótido.

Si se conoce la concentración de ADN libre, la constante de unión se puede calcular utilizando la ecuación 4.4. Los resultados obtenidos, recogidos en la Figura 4.5, muestran una dependencia sigmoideal de K_b con la concentración total de ADN para los cuatro metalosurfactantes preparados. La disminución en la constante de unión observada cuando la concentración de polinucleótido aumenta confirma el carácter cooperativo en la unión de tensioactivos catiónicos con el ADN³¹.

Para verificar la precisión del procedimiento utilizado en la obtención de los valores de las constantes de interacción, nos centramos en considerar el valor mínimo para dichas constantes de equilibrio. Las constantes de equilibrio calculadas tienen una contribución electrostática y otra no electrostática (debe resaltarse que las interacciones no electrostáticas tales como enlaces de hidrógeno o las interacciones de tipo π podría darse entre los ligandos del grupo de cabeza de tensioactivos y el polinucleótido). Cuando la concentración de ADN es muy elevada, son las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares del tensioactivo y los grupos fosfatos del ADN las que influyen en la asociación. Por tanto, el valor mínimo de K_b obtenido para [ADN] elevadas será debido principalmente a estas interacciones electrostáticas y, en consecuencia, este valor no dependerá de las interacciones hidrofóbicas de las cadenas alifáticas de los tensioactivo catiónicos (doble o simple).

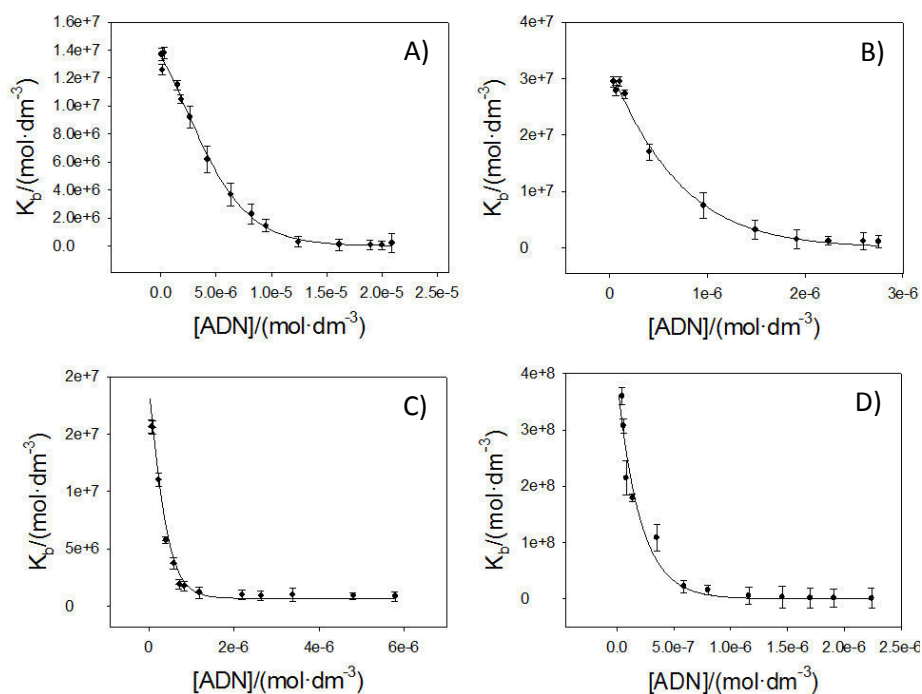


Figura 4.5. Variación de la constante de unión, K_b , en función de la concentración de ADN para los distintos tensioactivos: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.

Efectivamente, los valores mínimos de las K_b para los distintos tensioactivos son: $8.7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para los tensioactivos RuC11C11 y RuC1C11, $9.4 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC1C19 y $9.7 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para el RuC19C19. Como se puede observar los valores son muy parecidos entre sí, lo que nos indica que dicha constante no depende de la cadena hidrofóbica de los tensioactivos, como se esperaba. Además, este valor concuerda con la constante de unión previamente obtenida para la interacción del complejo metálico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (sin cadenas alifáticas) con ADN³², que tiene un valor de $8,0 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, la formación de hemimicelas en la superficie del ADN juega un papel importante en la compactación del polinucleótido. La adición de moléculas cíclicas que interaccionen con las cadenas hidrofóbicas de los tensioactivos minimizarían la interacción entre las cadenas de los tensioactivos y, por lo tanto, podría cambiar el valor de X_c . De acuerdo con el estudio realizado en el capítulo 3, la α -ciclodextrina (α -CD) interacciona con los cuatro metalosurfactantes para formar complejos de inclusión, donde las colas de los tensioactivos se ubican en la cavidad del receptor (ciclodextrina). Las estequiometrías de los complejos tensioactivo/CD en disolución acuosa son 1:1 y 1:2 para los tensioactivos RuC1C11 y RuC11C11 y 1:1, 1:2 y 1:3 para los tensioactivos RuC1C19 y RuC19C19. Las intensidades de emisión de RuC11C11, RuC1C11, RuC19C19 y RuC1C19 se midieron en presencia de una concentración fija de tensioactivo y diferentes cantidades de α -CD. En todos los casos, se observó una disminución inicial en la intensidad de emisión de los tensioactivos cuando aumentaba X y, después de alcanzar un valor mínimo, el aumento en la relación de concentraciones X provocó un aumento en la intensidad de emisión. Sin embargo, el valor de X al que se obtiene el mínimo en la intensidad de emisión (es decir, X_c) varía dependiendo de la concentración de ciclodextrina (ejemplos de esta variación están recogidos en la Figura 4.6). Los valores de X_c obtenidos a las diferentes concentraciones de ciclodextrina se pueden ver en la Tabla 4.1.

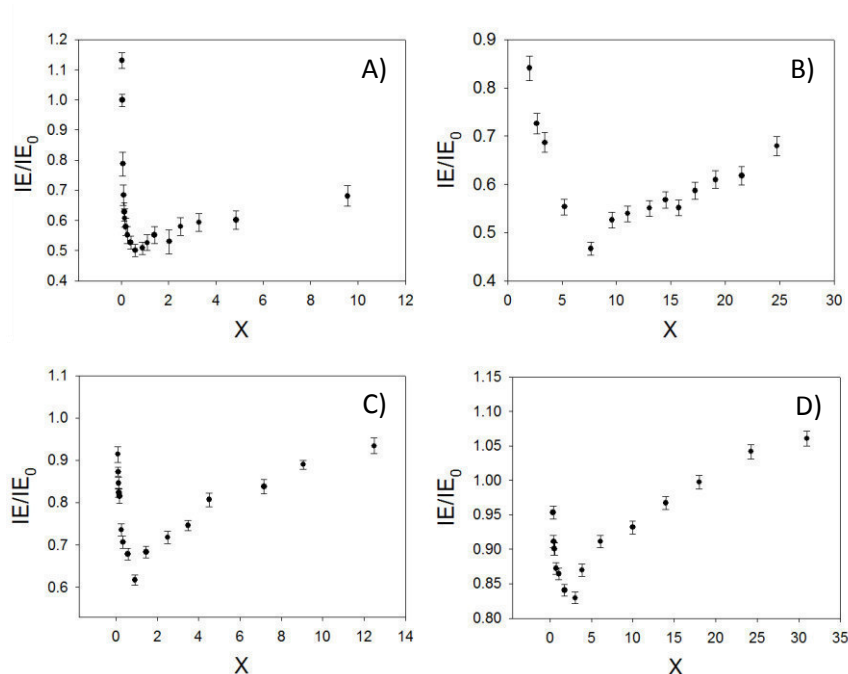


Figura 4.6. Variación de la intensidad de emisión relativa del complejo tensioactivo/ADN a diferentes valores de X en presencia de una concentración fija de α -CD para los distintos tensioactivos: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.

Tabla 4.1. Valores de X_c en función de la concentración de α -CD para los cuatro metalosurfactantes preparados.

RuC11C11		RuC1C11		RuC19C19		RuC1C19	
α -CD/M	X_c	α -CD/M	X_c	α -CD/M	X_c	α -CD/M	X_c
0	0.24	0	1.24	0	0.16	0	0.91
$2.50 \cdot 10^{-6}$	0.60	$1.50 \cdot 10^{-7}$	1.37	$5.00 \cdot 10^{-7}$	0.22	$1.00 \cdot 10^{-7}$	1.18
$5.00 \cdot 10^{-6}$	0.64	$2.25 \cdot 10^{-7}$	1.37	$1.00 \cdot 10^{-6}$	0.30	$5.00 \cdot 10^{-7}$	1.46
$6.00 \cdot 10^{-6}$	0.92	$3.00 \cdot 10^{-7}$	2.99	$2.50 \cdot 10^{-6}$	0.74	$1.00 \cdot 10^{-6}$	3.00
$6.25 \cdot 10^{-6}$	1.24	$3.37 \cdot 10^{-7}$	4.95	$3.50 \cdot 10^{-6}$	1.98	$1.00 \cdot 10^{-6}$	4.82
$6.50 \cdot 10^{-6}$	1.60	$4.50 \cdot 10^{-7}$	7.92	$4.00 \cdot 10^{-6}$	2.50	$5.00 \cdot 10^{-5}$	5.44
$6.75 \cdot 10^{-6}$	2.51	$8.25 \cdot 10^{-7}$	7.65	$5.00 \cdot 10^{-6}$	2.80	$1.00 \cdot 10^{-4}$	5.87
$7.50 \cdot 10^{-6}$	2.90	$1.20 \cdot 10^{-6}$	7.65	$7.00 \cdot 10^{-6}$	3.12		
$1.00 \cdot 10^{-5}$	3.70			$2.00 \cdot 10^{-5}$	3.41		
$2.50 \cdot 10^{-5}$	4.50			$4.00 \cdot 10^{-5}$	3.45		

Si representamos los valores de X_c obtenidos para las distintas concentraciones de ciclodextrina, frente a la concentración del macrociclo se observa un comportamiento sigmoidal (ver Figura 4.7.).

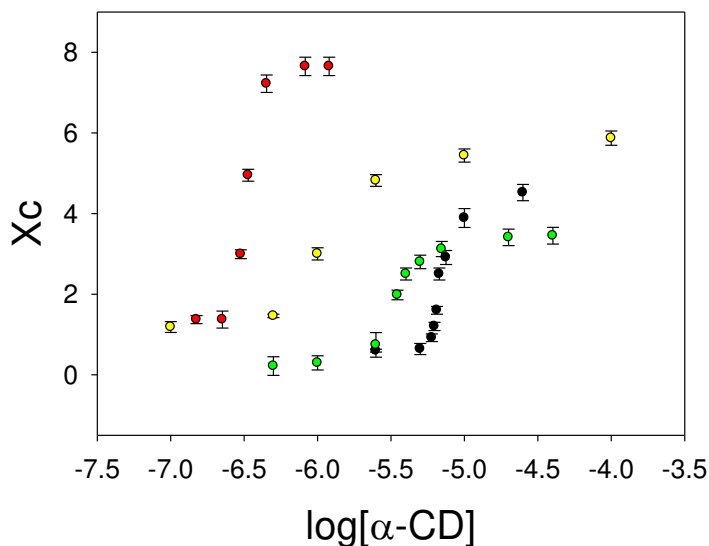


Figura 4.7. Representación de la dependencia de X_c de la concentración de α -CD. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19.

La variación en X_c puede explicarse a partir de considerar que la formación de complejos de inclusión tensioactivo/CD dificulta las interacciones entre las cadenas alifáticas de los tensioactivo en la superficie del ADN, además de reducir el carácter cooperativo del proceso de interacción de las moléculas de tensioactivo con el ADN. Por lo tanto, es necesaria una concentración más alta de tensioactivo para compactar el ADN en presencia de ciclodextrinas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la concentración de ciclodextrina necesaria para decompactar el ADN es menor para los tensioactivos que poseen una sola cadena RuC1C11 y RuC1C19 que para los tensioactivos que tienen dos cadenas (ver Figura 4.7.). Esto es debido a que los efectos hidrofóbicos hacen más favorable los procesos de auto-asociación, ya

sea en disolución o en la superficie del ADN, para los tensioactivos que tienen doble cadena, con respecto a los de cadena simple.

Además, se ha observado que existe un valor de concentración de ciclodextrina a partir del cual el valor de X_c no se modifica. Esto se debe a que, a partir de este valor, el sistema tensioactivo/ADN/CD se satura.

Las diferencias entre los tensioactivos de una sola cadena son apreciables. Así, la variación de X_c observada es más pronunciada para el tensioactivo de cadena más corta (RuC1C11) que para el de cadena más larga (RuC1C19). Otra diferencia clara es que el valor de X_c al cual tiene lugar la Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la interacción tensioactivo/ADN es más fuerte y más cooperativo en el caso del RUC1C19 que para RUC1C11, como puede verse en la Figura 4.5. Por lo tanto, el desplazamiento del equilibrio de asociación del tensioactivo al polinucleótido es más difícil para el tensioactivo de cadena más larga. Esta tendencia es difícil de explicar en base a las constantes de formación de los complejos de inclusión tensioactivo/CD, dadas las distintas estequiometrías de estos complejos para los dos tensioactivos, así como los valores de las constantes de asociación correspondientes.

Con respecto a los resultados obtenidos con los tensioactivos de dos cadenas, no se puede llegar a unas conclusiones tan claras como para los de una única cadena alifática. En el caso de los tensioactivos bicatenarios, los resultados son semejantes para los tensioactivos RUC11C11 y RUC19C19.

Las interacciones entre los monómeros de tensioactivo y el ADN también se pueden estudiar mediante el empleo de moléculas que actúan como desactivadores de fluorescencia (quenching) de los tensioactivos. Se midieron las intensidades de emisión de los distintos tensioactivos a distintas concentraciones del quencher ($S_2O_8^{2-}$) en ausencia y en presencia del polinucleótido, variando la concentración de éste. Este proceso de

desactivación es dinámico, como se indicó anteriormente en el capítulo 3 de esta tesis y se describe por la ecuación de Stern-Volmer³⁶:

En la Figura 4.8 se muestra la dependencia lineal en la representación de I_{E_0}/I_E frente a la $[Q]$ (ecuación 3.11). Los valores relativos de K_{SV} (relativos al valor de K_{SV} en ausencia de ADN) obtenidos a partir del uso de la ecuación 3.11 para todos los tensioactivos empleados se muestran en la Figura 4.9.

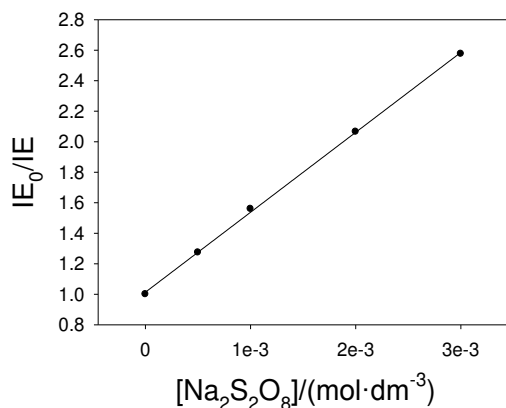
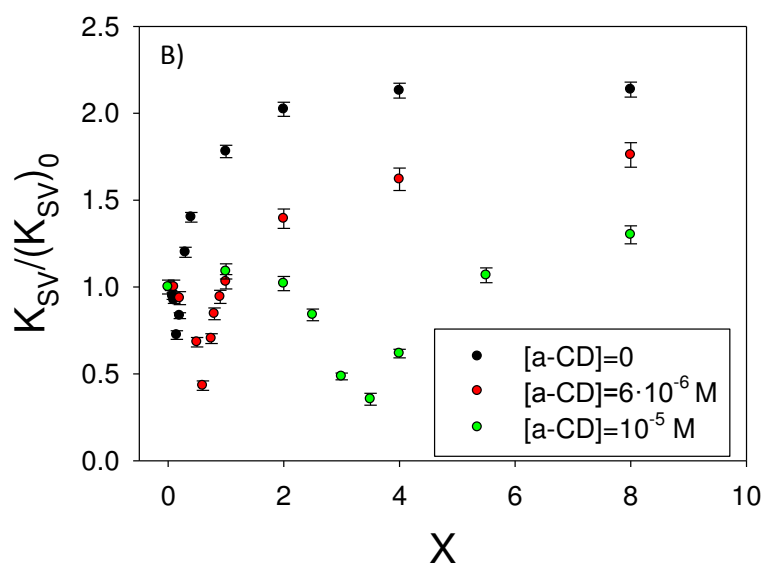
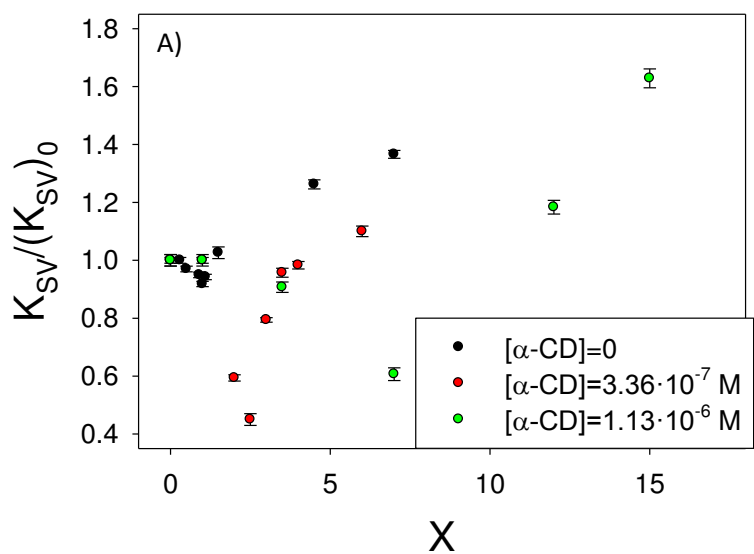


Figura 4.8. Representación de la ecuación de Stern-Volmer en presencia de α -CD, empleando como quencher el ion $S_2O_8^{2-}$. Para el tensioactivo RuC11C11 con $X=0.4$ en ausencia de ciclodextrina.



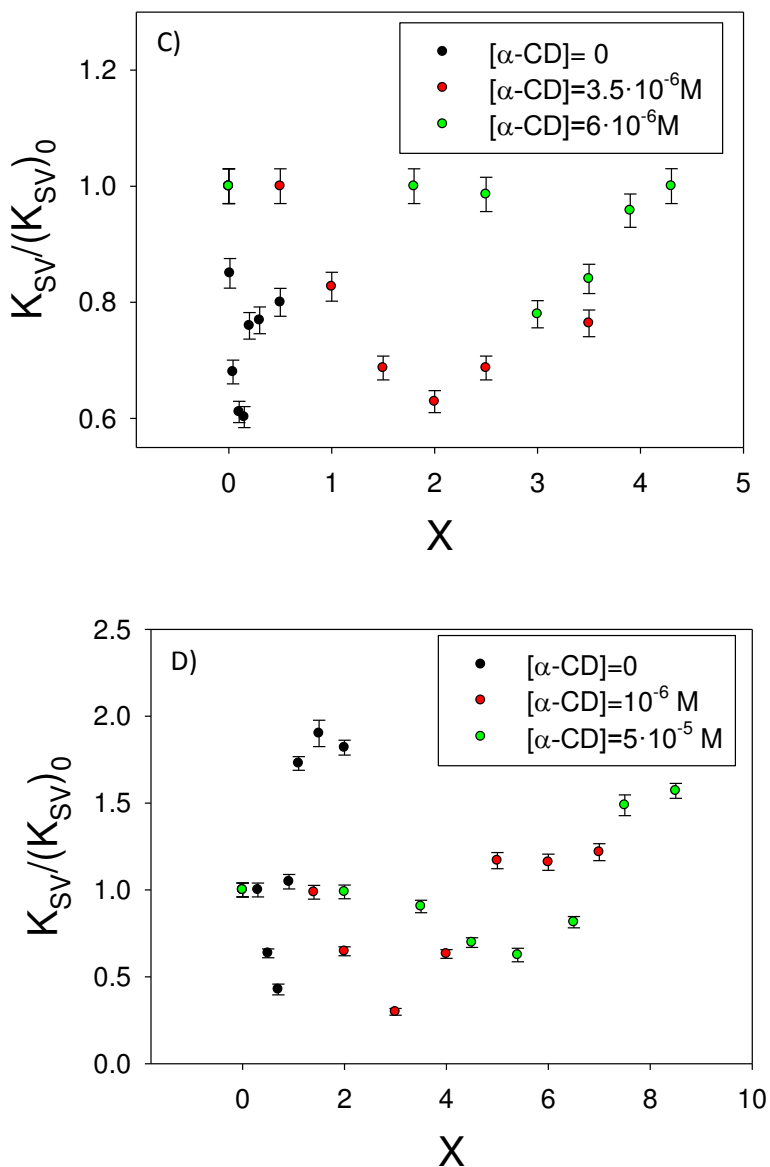


Figura 4.9. Representación gráfica de los valores de K_{SV} relativos frente a X , a diferentes concentraciones de α -CD, para los tensioactivos: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19. $(K_{SV})_0$ representa la constante de Stern-Volmer en disolución acuosa, en ausencia de ADN.

Los resultados muestran que un aumento inicial en el valor de X da como resultado una disminución del valor de la constante de equilibrio K_{SV} , hasta que se alcanza un valor mínimo. Un incremento adicional de X conduce a un aumento en dicha constante de equilibrio. Cuando la relación $[\text{tensioactivo}]/[\text{ADN}]$ es pequeña, la carga del sistema es negativa (hay en el medio más grupos fosfatos que cargas positivas provenientes de la cabeza polar de los tensioactivos). En estas condiciones, el acercamiento de los iones $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ a las cabezas metálicas de los metalosurfactantes se ve impedido por las repulsiones que sufrirán ambas especies aniónicas (quencher y ADN). Este hecho explica la disminución inicial observada para los valores de K_{SV} . Tras el proceso de saturación del ADN, que ocurre a un valor de la relación molar igual a X_c , un aumento de la concentración de tensioactivo añadido al medio va asociado a un aumento en la concentración de moléculas anfifílicas libres (no unidas al ADN). Estas moléculas de tensioactivo que se encuentran en el seno de la disolución son más accesibles a los iones peroxodisulfato, y esto se ve reflejado en un aumento en los valores de las constantes K_{SV} . Esta hipótesis está respaldada por el siguiente hecho: los valores de X para los cuales la relación $K_{SV}/(K_{SV})_0$ alcanza un valor mínimo en ausencia de ciclodextrina ($X_c \approx 0.20, 1.10, 0.15$ y 0.79 para RuC11C11, RuC1C11, RuC19C19 y RuC1C19, respectivamente), son similares a los valores de X_c obtenidos a partir de las experiencias mostradas en la Figura 4.4.

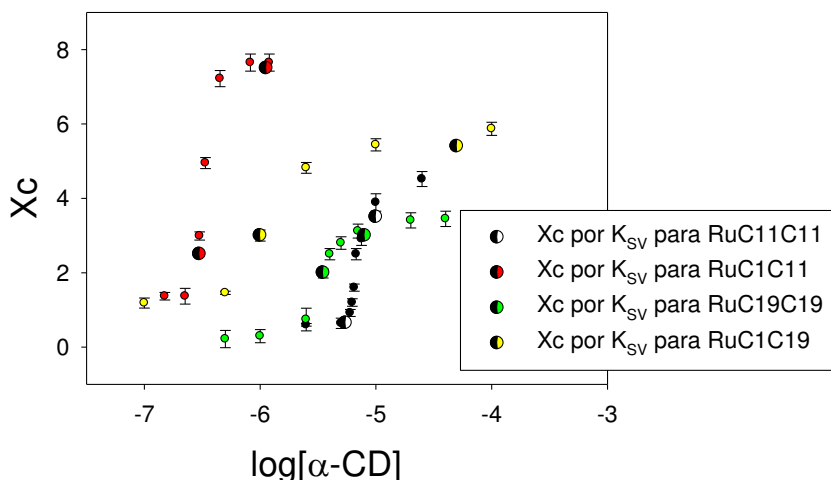


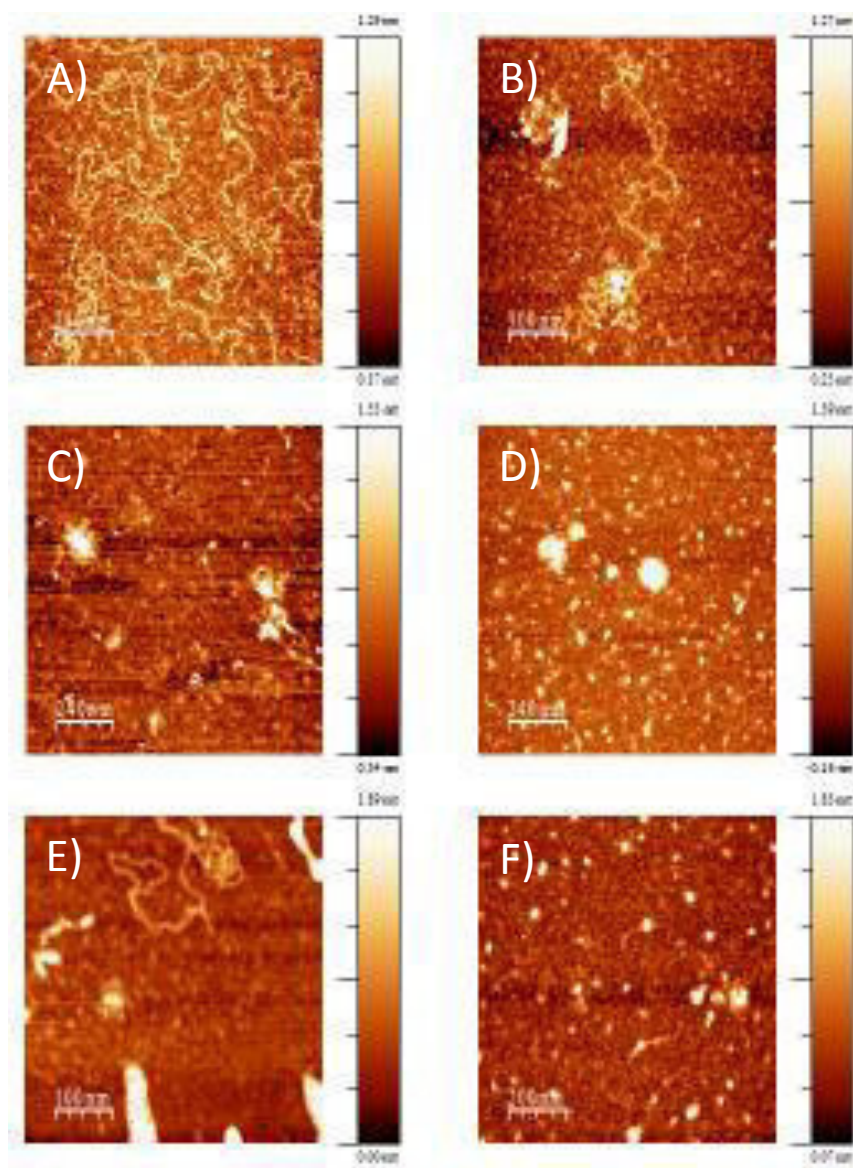
Figura 4.10. Representación de los valores de X_c obtenidos mediante los dos métodos (fluorescencia estática y quenching) frente al logaritmo de la concentración de α -CD. Fluorescencia estática (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19. Quenching (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19

También se han obtenido resultados parecidos en presencia de ciclodextrinas. Como se puede ver en Figura 4.10, los valores de X_c obtenidos por desactivación de fluorescencia para los distintos tensioactivos (puntos de dos colores en Figura 4.10) en presencia de ciclodextrina encajan dentro de la tendencia obtenida para estos metalosurfactantes mediante medidas de fluorescencia estática (puntos de un solo color en la Figura 4.10).

Con el fin de visualizar si las interacciones tensioactivo/DNA resultan en una compactación del polinucleótido, se obtuvieron imágenes topográficas por AFM de estos complejos a diferentes relaciones de concentración X . En la Figura 4.11. A) se puede observar la imagen de las hebras de ADN con la conformación extendida, o espiral alargada, que suele presentar en disolución. La adición de pequeñas cantidades de metalosurfactante provoca pequeños cambios conformacionales (condensaciones parciales) en el polinucleótido

(ver Figura 4.11 B), E), G) y J)). La condensación total ocurre a partir de valores de X mayores que X_c (ver Figura 4.11 D), H), I) y L)). De acuerdo con las imágenes de AFM, la adición de metalosurfactantes produce la flexión de las cadenas de ADN con la formación de diferentes bucles que, finalmente, da como resultado la obtención de agregados con una estructura globular compacta.

Como se menciona en la introducción de esta Tesis, uno de los métodos de decompactación de los complejos tensioactivo/ADN usados consiste en aumentar la concentración de tensioactivo de una forma considerable. Este mecanismo de descompactación no se produce en todos los sistemas tensioactivo/ADN. El hecho de aumentar la concentración de tensioactivo provoca unos cambios estructurales en los agregados premicelares, responsables de la compactación del polinucleotido, que hacen que estos agregados no tengan la simetría adecuada para que se produzca dicha compactación. Los contraiones del tensioactivo también influyen en el proceso de decompactación porque intervienen procesos de intercambio iónico que rompen el complejo tensioactivo/ADN. Con el fin de comprobar si



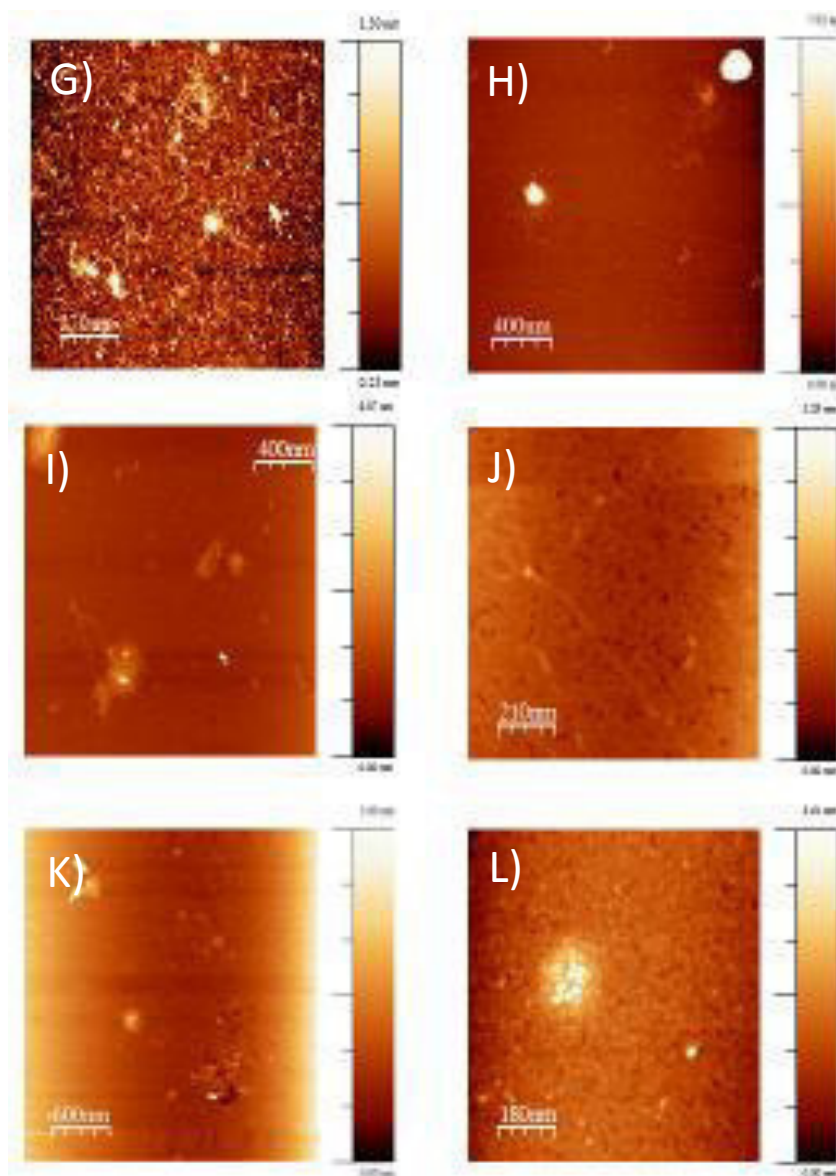


Figura 4.11. Imágenes topográficas por AFM de los complejos tensioactivo/ADN formados para los cuatro tensioactivos a distintos valores de X: A) ADN; RuC11C11: B) X=0.08; C) X=0.2; D) X=1.5. RuC1C11: E) X=0.2; F) X=1; G) X=2. RuC19C19: H) X=0.08; I) X=1. RuC1C19: J) X=0.5; K) X=0.95; L) X=3.

el sistema que nos ocupa puede sufrir una descompactación al aumentar la concentración de tensioactivo se ha obtenido el perfil topográfico tridimensional (mediante el uso de la técnica de AFM) de la disolución tensioactivo/ADN de dos muestras que tienen una concentración de tensioactivo muy superior a la necesaria para que se produzca la compactación del polinucleótido. Como podemos observar en la Figura 4.12, en ninguno de los casos estudiados la adición de una elevada concentración de tensioactivo al medio lleva asociado el proceso de descompactación del polinucleótido.

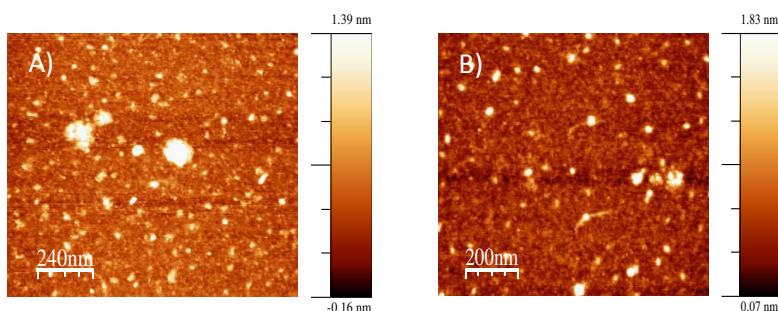


Figura 4.12. Imágenes topográfica por AFM del complejo tensioactivo/ADN a una relación de $X=10$. A) RuC11C11 y B) RuC1C11.

La técnica de microscopía confocal también proporciona información sobre el cambio conformacional del ADN en presencia de monómeros de los metalosurfactantes preparados en este trabajo. Las imágenes se recogen en la Figura 4.13. Cuando se adiciona ADN a la disolución a una relación de $X = 0.08$, los monómeros en la disolución se ubican en la superficie del polinucleótido. Las Figura 4.13 A) y C) muestran la estructura extendida que tiene el ADN a esta relación molar X . Las Figura 4.13 B) y D) muestran las imágenes de la estructura globular del polinucleótido a un valor $X=0.4$, en el cual el ácido nucleico se encuentra totalmente condensado. No se muestran imágenes de monómeros en disolución, en ausencia de ADN, debido a que prácticamente

estas moléculas no mostraron señal alguna a las concentraciones usadas en este trabajo.

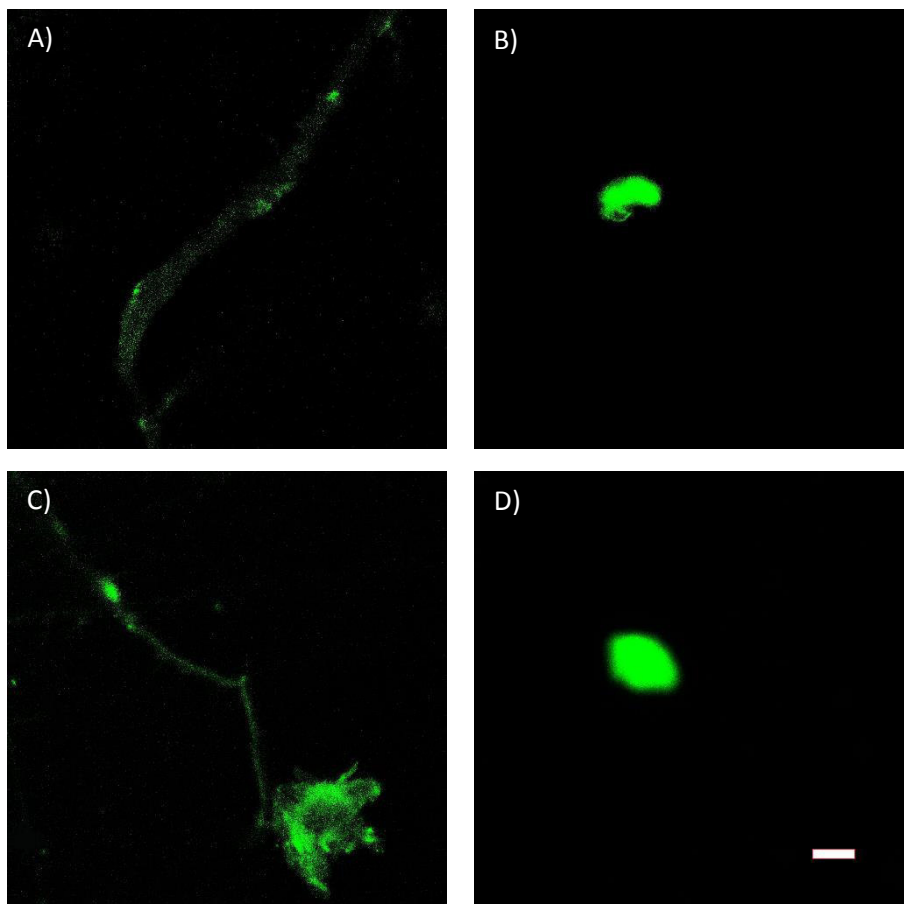


Figura 4.13. Imágenes de microscopia de fluorescencia confocal para RuC11C11 (A $X=0.08$, B $X=0.40$) y para RuC19C19 (C $X=0.08$, D $X=0.40$) en una escala de 5 μm .

Si comparamos las Figura 4.13 A) y C) se aprecia que, para el mismo valor de X , el grado de compactación del polinucleótido obtenido es mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrofóbica, como era de esperar si se consideran las interacciones hidrofóbicas, que serán más acentuadas cuanto mayor sea el carácter apolar de sus colas hidrocarbonadas.

4.3 Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Los metalosurfactantes RuC11C11, RuC1C11, RuC19C19 y RuC1C19 inducen un cambio conformacional del polinucleotido desde un estado de doble hélice extendida (un estado correspondiente a una bobina extendida) a un estado compacto con forma de ovillo. Esta condensación se debe a la formación en la superficie del polinucleotido de agregados premicelares o hemimicelas.

2. A partir del cálculo de la fracción de tensioactivo que interacciona con el polinucleótido, se ha cuantificado el valor de la constante de interacción tensioactivo/ADN. Dicho valor disminuye conforme aumenta la concentración de ADN en el medio, lo que confirma el carácter cooperativo de dicho enlace.

3. La presencia de moléculas de ciclodextrina en el medio afecta a las interacciones tensioactivo-ADN, ya que se forman complejos de inclusión de tipo 1:1, 1:2 y 1:3 (dependiendo del metalosurfactante). Este hecho provoca cambios en el proceso de compactación del ADN, llegando incluso a permitir la reversibilidad del fenómeno de condensación.

4. La reversibilidad del proceso de compactación de los sistemas estudiados no se consigue empleando concentraciones altas de tensioactivos, como ocurre en otros casos.

4.4 Bibliografía

- (1) Horton, H. R.; Moran, L. A.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D.; Rawn, J. D. *Principios de Bioquímica*, 4th ed.; 2008.
- (2) Passarge, E. *GENÉTICA Texto Y Atlas.*, 3rd ed.; panamericana: New York, 2007.
- (3) Girod, J. C.; Johnson, W. C.; Huntington, S. K.; Maestre, M. F. Conformation of Deoxyribonucleic Acid in Alcohol Solutions. *Biochemistry* **1973**, *12* (25), 5092–5096.
- (4) Huey, R.; Mohr, S. C. Condensed States of Nucleic Acids. III. (+) and (-) Conformational Transitions of DNA Induced by Ethanol and Salt. *Biopolymers* **1981**, *20* (12), 2533–2552.
- (5) Lyklema, J. Overcharging, Charge Reversal: Chemistry or Physics? *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *291* (1–3), 3–12.
- (6) Besteman, K.; Van Eijk, K.; Lemay, S. G. Charge Inversion Accompanies DNA Condensation by Multivalent Ions. *Nat. Phys.* **2007**, *3* (9), 641–644.
- (7) Chai, A. H.; Ran, S. Y.; Zhang, D.; Jiang, Y. W.; Yang, G. C.; Zhang, L. X. Processes of DNA Condensation Induced by Multivalent Cations: Approximate Annealing Experiments and Molecular Dynamics Simulations. *Chinese Phys. B* **2013**, *22* (9).
- (8) Cohen, P.; Kidson, C. Conformational Analysis of DNA-Poly-L-Lysine Complexes by Optical Rotatory Dispersion. *J. Mol. Biol.* **1968**, *35*, 241–245.
- (9) Shapiro, J. T.; Leng, M.; Felsenfeld, G. Deoxyribonucleic Acid-Polylysine Complexes. Structure and Nucleotide Specificity. *Biochemistry* **1969**, *8* (8), 3219–3232.
- (10) Suwalsky, M.; Traub, W. A Comparative X-ray Study of a Nucleoprotamine and DNA Complexes with Polylysine and Polyarginine. *Biopolymers* **1972**, *11* (11), 2223–2231.

- (11) Fasman, G. D.; Schaffhausen, B.; Goldsmith, L.; Adler, A. Conformational Changes Associated with F-1 Histone-Deoxyribonucleic Acid Complexes. Circular Dichroism Studies. *Biochemistry* **1970**, *9* (14), 2814–2822.
- (12) Adler, A. J.; Moran, E. C.; Fasman, G. D. Complexes of DNA with Histones f2a2 and f3. Circular Dichroism Studies. *Biochemistry* **1975**, *14* (19), 4179–4185.
- (13) Gosule, L. C.; Schellman, J. A. Compact Form of DNA Induced by Spermidine. *Nature* **1976**, *259* (5541), 333–335.
- (14) Prado-Gotor, R.; Grueso, E. A Kinetic Study of the Interaction of DNA with Gold Nanoparticles: Mechanistic Aspects of the Interaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (4), 1479–1489.
- (15) Sharma, A. K.; Gupta, L.; Gupta, U. *Nanoparticles as Nucleic Acid Delivery Vectors*; Elsevier Ltd, 2017.
- (16) Jiménez Blanco, J. L.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. Molecular Nanoparticle-Based Gene Delivery Systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *42*, 18–37.
- (17) Haq, I.; Lincoln, P.; Suh, D.; Norden, B.; Chowdhry, B. Z.; Chaires, J. B. Interaction of Δ - and Λ -[Ru(phen)2DPPZ]²⁺ with DNA: A Calorimetric and Equilibrium Binding Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (17), 4788–4796.
- (18) Meng, X.; Liu, L.; Zhou, C.; Wang, L.; Liu, C. Dinuclear copper(II) Complexes of a Polybenzimidazole Ligand: Their Structures and Inductive Roles in DNA Condensation. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (15), 6572–6574.
- (19) Bloomfield, V. A. DNA Condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6* (3), 334–341.
- (20) Bloomfield, V. A. DNA Condensation by Multivalent Cations. *Biopolymers* **1997**, *44* (3), 269–282.
- (21) Pelta, J.; Livolant, F.; Sikorav, J. L. DNA Aggregation Induced by Polyamines and Cobalthexamine. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (10), 5656–5662.

- (22) Yang, X.; Jian, X.; Wang, J.; Zhang, H.; Jiang, F. Interaction of a Fluorescent Cationic Surfactant Bearing a Coumarin Derivative with DNA. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *462*, 170–178.
- (23) Xu, L.; Feng, L.; Hao, J.; Dong, S. Compaction and Decomposition of DNA Dominated by the Competition between Counterions and DNA Associating with Cationic Aggregates. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *134*, 105–112.
- (24) Li, X.; Sun, D.; Chen, Y.; Wang, K.; He, Q.; Wang, G. Studying Compaction-Decompaction of DNA Molecules Induced by Surfactants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495* (4), 2559–2565.
- (25) Hanna, E.; Rémuzat, C.; Auquier, P.; Toumi, M. Gene Therapies Development: Slow Progress and Promising Prospect. *J. Mark. Access Heal. Policy* **2017**, *5* (1), 1265293.
- (26) Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V.; Goulko, A. A. Ethidium Bromide as a Promising Probe for Studying DNA Interaction with Cationic Amphiphiles and Stability of the Resulting Complexes. *Langmuir* **2002**, *18* (26), 10348–10356.
- (27) Khorsandi, K.; Rabbani-Chadegani, A. Investigation on the Chromium Oxide Interaction with Soluble Chromatin and Histone H1: A Spectroscopic Study. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *70*, 57–63.
- (28) Grueso, E.; Cerrillos, C.; Hidalgo, J.; Lopez-Cornejo, P. Compaction and Decomposition of DNA Induced by the Cationic Surfactant CTAB. *Langmuir* **2012**, *28* (30), 10968–10979.
- (29) Parodi, S.; Kendall, F.; Nicolini, C. A Clarification of the Complex Spectrum Observed with the Ultraviolet Circular Dichroism of Ethidium Bromide Bound to DNA. *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2* (4), 477–486.
- (30) Menger, F. M.; Portnoy, C. E. On the Chemistry of Reactions Proceeding Inside Molecular Aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (18), 4698–4703.
- (31) Mel'nikov, S. M.; Sergeyev, V. G.; Yoshikawa, K. Discrete Coil—Globule

- Transition of Large DNA Induced by Cationic Surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (9), 2401–2408.
- (32) Lopes-Costa, T.; Sanchez, F.; Lopez-Cornejo, P. Cooperative and Noncooperative Binding of * Ru (Bpy)₃²⁺ to DNA and SB4 . 5G Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* . **2009**, *113*, 9373–9378.
- (33) López-Cornejo, P.; Sánchez, F. Micellar Effects on the Kinetics of the Oxidation of the Excited State of the [Ru(bpy)₃]²⁺ Complex by S₂O₈²⁻. A Comparison of Different Approaches for the Interpretation of Micellar Effects on Kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (43), 10523–10527.
- (34) Lopes-Costa, T.; Lopez-Cornejo, P.; Villa, I.; Perez-Tejeda, P.; Prado-Gotor, R.; Sanchez, F. Salt and Solvent Effects on the Kinetics of the Oxidation of the Excited State of the [Ru(bpy)₃]²⁺ Complex by S₂O₈²⁻. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (12), 4196–4201.
- (35) Lopes-Costa, T.; Sanchez, F.; Lopez-Cornejo, P. Cooperative and Noncooperative Binding of * Ru (Bpy)₃²⁺ to DNA and SB4 . 5G Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* . **2009**, *113*, 9373–9378.
- (36) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin/C.; 1978.

Capítulo 5º.

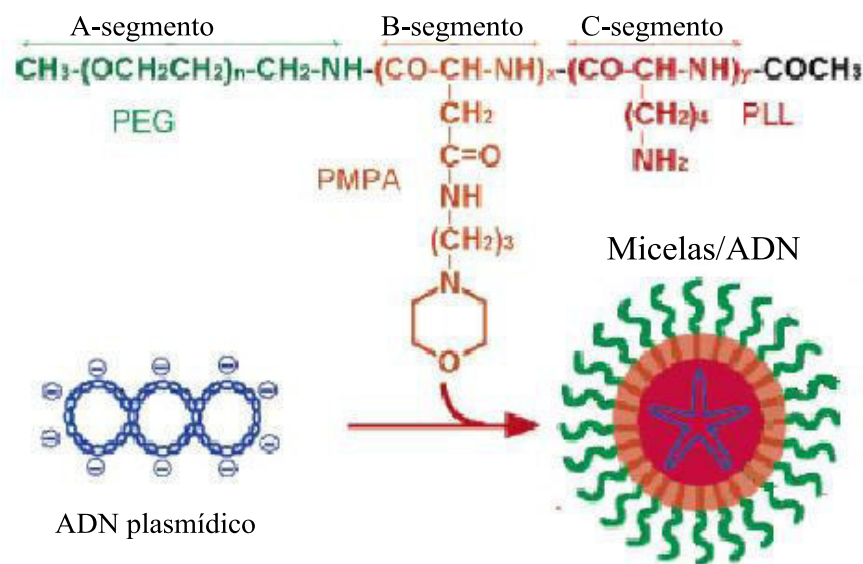
Metalomicelas y su
interacción con ADN

En las últimas décadas se han llevado a cabo muchos estudios que tratan sobre el potencial de los tensioactivos catiónicos para ser utilizados tanto en el transporte de fármacos, como en el de material genético. Es decir, en terapia génica¹⁻⁴. Dadas las características anfipáticas de los tensioactivos, éstos se ensamblan para formar diferentes tipos de agregados⁵. Son las micelas⁶ los agregados más comunes, generalmente esféricos, que se forman en disolventes polares. Como se ha descrito en el apartado 1.5 de la introducción de esta tesis, estos agregados se caracterizan por la orientación que adquieren las moléculas anfifílicas que los constituyen.

Un ejemplo de empleo de micelas poliméricas como vector de medicamentos es el propuesto por Matsumura y colaboradores⁷. Estos investigadores emplearon micelas del copolímero NK911. Es un copolímero de bloque de PEG-poli(ácido aspártico) conjugado. Estas micelas pueden encapsular a la doxorrubicina, un medicamento anticancerígeno, dado que esta interacciona con el ácido aspártico (parte hidrofóbica del copolímero). Una de las ventajas observadas cuando se ha utilizado este vector fue la disminución de los efectos secundarios de este medicamento.

Los estudios que se pueden encontrar en la bibliografía sobre el empleo de micelas como vectores para terapia génica no son numerosos. Fukushima y colaboradores⁸ prepararon micelas de copolímeros (PEG-PMMA-PLL), constituidos por un bloque de poli(etilenglicol), otro de poli(3-morfolinopropil) aspartamida, y un tercer bloque de poli(L-lisina). Estos autores mostraron cómo estas micelas condensan el ADN. Además, poseen una excelente capacidad para cargar material genético y liberarlo en el interior de las células, respondiendo a los cambios de pH del microentorno (ver Esquema 5.1). Recientemente, Convertine y colaboradores⁹ han investigado el empleo de micelas de dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA), ácido acrílico y butilmetacrilato para encapsular ARN pequeño de interferencia, ARNip,

(RNAsi). Los resultados mostraron una mayor eficacia de transfección y una menor toxicidad que cuando se utilizan polipéptidos convencionales.

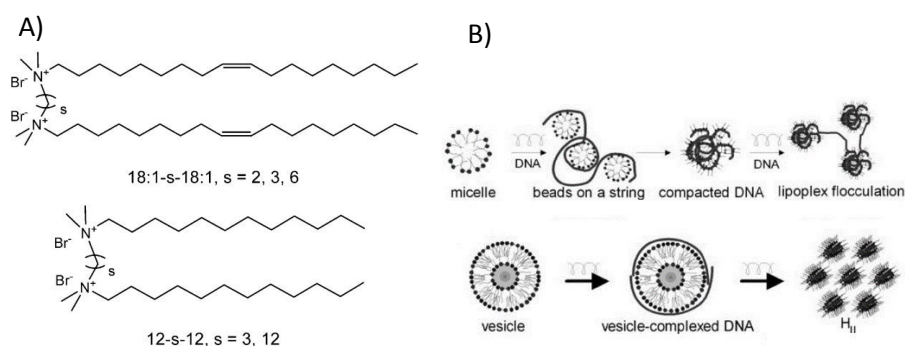


Esquema 5.1. Encapsulación de ADN plasmídico, pADN, en el interior de una micela polimérica.

Como se puede observar, ninguno de los casos descritos en esta introducción engloba el empleo de micelas constituidas por monómeros de tensioactivos catiónicos. En todos los casos expuestos se prepararon micelas poliméricas.

Chuanzhong Wang y colaboradores¹⁰ publicaron un estudio de la interacción de ADN con micelas formadas por tensioactivos gémini catiónicos (ver Esquema 5.2 A). En este trabajo se estudió los cambios conformacionales que sufre un polinucleótido en disolución cuando aumenta la concentración de los tensioactivos géminis. También se estudió la interacción del polinucleótido con vesículas formadas por los tensioactivos y el fosfolípido DOPE, en distintas proporciones. Además, mostraron cómo las estructuras de

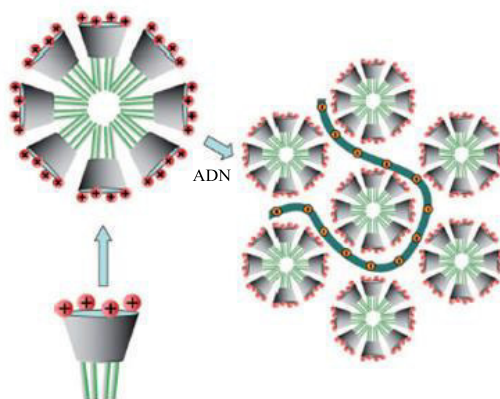
estos agregados afectaban de forma considerable a la conformación del polinucleótido. Se observó una inversión de carga del ADN a relaciones de carga (+/-) elevadas. Este cambio en la carga del ADN iba acompañado por cambios conformacionales que pudieron visualizarse empleando la microscopia de fuerza atómica (AFM). Los autores proponen el modelo mostrado en el Esquema 5.2 B para explicar la interacción entre estos agregados y el polinucleótido.



Esquema 5.2. A) Tensioactivos gémis empleados en el trabajo. B) Formación de los complejos entre el ADN y los distintos agregados.

En la bibliografía se encuentran varios artículos en los que se han estudiado la interacción de micelas compuestas por tensioactivos catiónicos derivados de calixarenos y el ADN^{11,12}. En estos artículos se observó, a partir de medidas de intensidad de emisión de fluorescencia del bromuro de etidio (EtBr), que un aumento en la concentración de micelas resultaba en el desplazamiento del EtBr desde su posición entre los pares de bases del ADN hacia la disolución. Esto podría tomarse como una indicación de que el polinucleótido sufre un cambio conformacional en presencia de las micelas. También se han observado que el tamaño de los complejos micelas/ADN disminuye al aumentar la longitud de las cadenas de los tensioactivos, lo que se explica por un aumento en las interacciones hidrofóbicas.

En el estudio de Roman V. Rodik y colaboradores¹¹ emplean tres tipos de complejos derivados de calix-4-areno y estudian su interacción con el ADN. Dos de ellos solo difieren en la longitud de las cadenas alifáticas (3 y 8 átomos de carbono) y un tercero tiene una cadena alifática de 8 átomos de carbono, pero difiere en la naturaleza de las abejas polares. En otro trabajo más reciente de los mismos autores,¹² se lleva a cabo un estudio similar pero con un número mayor de moléculas derivadas de calixarenos. En ambos artículos, se realizan medidas de citotoxicidad y de internalización celular de los complejos micelas/ADN, observándose una internalización eficaz del pADN en presencia de micelas y de las vesículas con DOPE.



Esquema 5.3. Agregación de los monómeros de tensioactivos catiónicos derivado de calixareno y la formación del complejo con el ADN.

En los últimos años se están utilizando tensioactivos que contienen metales en su estructura, denominados metalosurfactantes, como agentes terapéuticos para tratar enfermedades como el cáncer¹³. A partir de estos metalosurfactantes, se pueden construir agregados micelares que actúen como vectores transportadores de fármacos. Con este propósito, T. A. Wagay y K. Ismail¹⁴ estudiaron el fenómeno de agregación de metalosurfactante derivado de un complejo de cobalto (III). Se observó que los agregados formados son de gran tamaño y este aumenta al aumentar la concentración de

tensioactivo en disolución. Otro aspecto importante que observan los autores es que los valores de cmc obtenidos no están de acuerdo con los esperados por la serie de Hofmeister para el contraión usado es este metalosurfactante.

El principal objetivo de este capítulo es entender el tipo de estructuras formadas a partir de metalosurfactantes derivados del complejo metálico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, así como la influencia que ejerce la presencia del ADN en la autoasociación de dichas moléculas anfifílicas. También se pretende profundizar en el estudio de la interacción metalomicelas/ADN con el fin de establecer una relación entre las características estructurales del metalosurfactante y el fenómeno de compactación del ácido nucleico.

5.1 Preparación de muestras.

Todas las mediciones se realizaron a pH 7 con el uso de un tampón de cacodilato sódico y cloruro sódico ($I = 0.01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) y a una temperatura de $298.0 \pm 0.1 \text{ K}$

5.1.1 Medidas de Fluorescencia.

Los valores de CMC se obtuvieron a partir de titulaciones de fluorescencia a diferentes concentraciones de ADN. La concentración de polinucleótido se varió entre 0 y $1.00\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. La concentración de tensioactivo se varió en el intervalo $1.00\cdot 10^{-8}$ - $3.20\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, dependiendo de la naturaleza del mismo. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 456 nm y 600 nm, respectivamente.

Las intensidades de emisión de bromuro de etidio (EtBr) también se midieron en presencia de micelas y/o polinucleótido. Las concentraciones

utilizadas en estas medidas se llevaron a cabo utilizando dos relaciones de concentración $[\text{ADN}]/[\text{EtBr}]$ diferentes: 5 y 0.5. Las concentraciones de ADN y de EtBr utilizadas fueron: $[\text{ADN}] = 1.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $[\text{EtBr}] = 2.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[\text{ADN}] = 5.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $[\text{EtBr}] = 1.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, respectivamente. Las concentraciones de tensioactivos se variaron en función del valor de X ($[\text{surfactante}]/[\text{DNA}]$) deseado en cada caso. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas en estas medidas fueron 500 nm y 590 nm, respectivamente.

5.1.2 Medidas de Dicroísmo Circular.

La técnica de dicroísmo circular es muy utilizada para obtener información estructural de ácidos nucleicos y proteínas. En general, mediante el uso de esta técnica se registra el espectro de dicroísmo circular de la forma B del ADN, y se estudia la evolución que este espectro muestra al adicionar a la disolución especies que interaccionen con el polinucleótido. En este caso no se pudo realizar este tipo de estudio. Los metalosurfactantes preparados en esta tesis mostraron una banda de dicroísmo circular que aparecía en el mismo intervalo de longitud de onda que el que aparece el espectro del polinucleótido, por lo que no se obtuvieron resultados concluyentes.

Sin embargo, la molécula plana de EtBr presenta una banda de dicroísmo circular inducida cuando se encuentra intercalada entre pares de bases adyacentes de la estructura del polinucleótido¹⁵. Se registraron los espectros en el intervalo de longitudes de onda entre 280 a 370 nm, en presencia y ausencia de micelas y/o ADN. Las concentraciones utilizadas fueron las mismas que las utilizadas en las mediciones de fluorescencia.

5.1.3 Medidas de Potencial Zeta.

Las muestras se prepararon a partir de disoluciones concentradas de ADN y de metalosurfactante. Estas se mezclaron en las cantidades requeridas, siempre con concentraciones de surfactantes superiores a los valores de la CMC. Todas las mediciones se realizaron a una concentración fija de ADN de $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. La concentración de tensioactivo utilizada se varió de 0 hasta $3.00 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, dependiendo del valor de X requerido y/o el metalosurfactante estudiado.

5.1.4 Electroforesis en Gel de Agarosa.

El método empleado se describe en el capítulo Material y Método de esta tesis. Se usó una concentración de ADN fija ($3,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) y diferentes concentraciones de tensioactivo con el fin de obtener la relación molar X deseada.

5.1.5 Imágenes de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Con el fin de caracterizar las micelas formadas a partir de los metalosurfactantes sintetizados, se registraron imágenes TEM a diferentes muestras. Éstas se prepararon por impregnación en una rejilla de cobre de malla 200 tipo B recubierta con carbono. Las imágenes se procesaron con una cámara TEM CCD montada en la parte inferior y se grabaron con una resolución de 4Kx4K. Esta técnica se encuentra explicada en el apartado 2.2.5 de esta tesis.

5.1.6 Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Con el fin de registrar imágenes de moléculas de ADN aisladas, se registraron imágenes de microscopía de fuerza atómica (apartado 2.2.4). Para ello, teniendo en cuenta el elevado tamaño de las moléculas de ADN, se usaron soluciones muy diluidas de polinucleótido ($0.30 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Las imágenes de AFM de los complejos micelas/ADN se obtuvieron secando una gota de $30 \mu\text{L}$ de una disolución que contiene micela y ADN previamente depositada en mica modificada. La preparación de la muestra y de las placas de micas se encuentran descritas en el capítulo de Material y Método de esta tesis.

5.1.7 Microscopia Confocal.

Las medidas de microscopía confocal se han realizado a concentración de moléculas de metalosurfactantes constante y distintos valores de X. la concentración para los tensioactivos RuC11C11 y RuC19C19 es de $7.50\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ y las concentraciones de ADN se variaron para obtener los distintos valores de X entre 0 y $3.00\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

5.2 Resultados y discusión

Los tensioactivos RuC11C11, RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19 forman agregados micelares a partir de una determinada concentración de metalosurfactante llamada llamada concentración micelar crítica (CMC). El valor de esta CMC dependerá del balance lipofilia/hidrofilia de cada uno de los tensioactivos. Los valores de CMC de estas metallomicelas fueron ya obtenidos

en el capítulo 3 de esta tesis. Sin embargo, se encontró que a concentraciones elevadas de los tensioactivos se observaba una segunda CMC, a la que denotaremos como CMC*. Todos los valores de concentración micelar crítica (CMC y CMC*) se obtuvieron a partir de medidas de intensidades de emisión del complejo de rutenio que conforma la cabeza hidrofílica de los tensioactivos. Estos valores de intensidades de emisión presentaban distintos comportamientos, siempre lineal, en función de la concentración de las moléculas anfifílicas. El valor de CMC* se determinó a partir del punto de intersección de las tendencias lineales obtenidas (ver Figura 5.1.) (experiencias análogas se realizaron para obtener los valores de CMC en el capítulo 3 de esta tesis). Los resultados obtenidos de ambas concentraciones micelares se recogen en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** e acuerdo con los resultados, los valores de la CMC son mayores para los tensioactivos de una sola cadena que para los diméricos. Esto se explicó anteriormente. Los teniendo en cuenta las mayores interacciones hidrofóbicas entre las cadenas para estos últimos. Los valores de la CMC también disminuyen con el aumento de la longitud de las cadenas alifáticas por la misma razón. En cualquier caso.

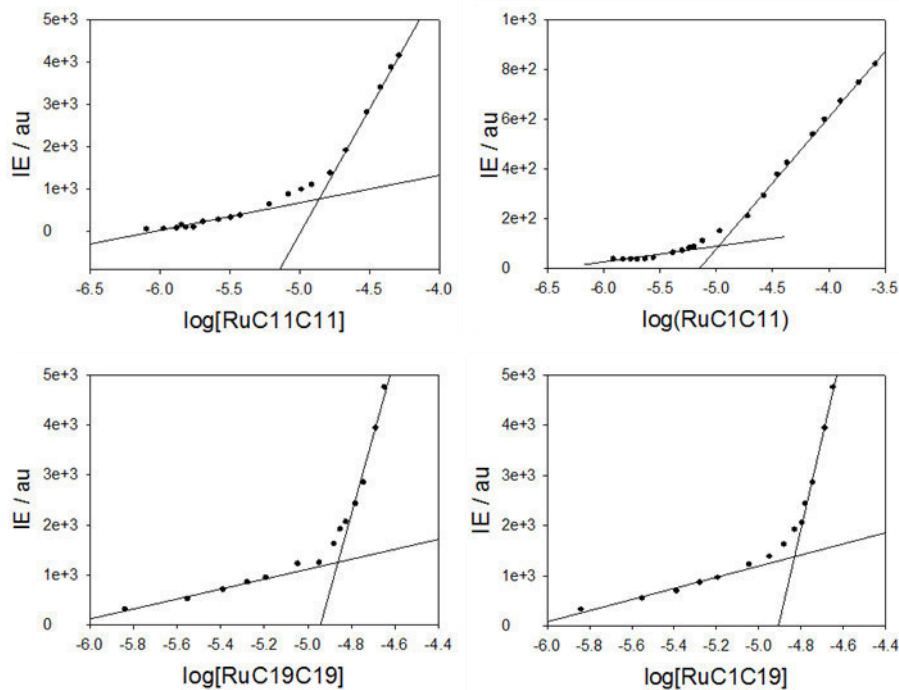


Figura 5.1. Representación de valores de intensidad de emisión de fluorescencia de los tensioactivos estudiados a diferentes concentraciones de estos. Las líneas representan el ajuste lineal de la tendencia. Del punto de corte de ambas tendencias lineales se obtiene el valor de CMC*.

Tabla 5.1. Valores de CMC y CMC* de los metalosurfactantes de Ru(II).

Tensioactivo	CMC/mol·dm ⁻³	CMC*/mol·dm ⁻³
RuC11C11	$(5.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	$(1.40 \pm 0.05) \cdot 10^{-5}$
RuC1C11	$(2.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-6}$	$(1.00 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$
RuC19C19	$(3.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	$(1.40 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$
RuC1C19	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$	$(1.50 \pm 0.03) \cdot 10^{-5}$

Con respecto a los valores obtenidos de la segunda CMC, CMC*, éstos prácticamente no dependen del carácter hidrofóbico de la molécula, número de cadenas alifática o longitud de éstas.

Con el fin de obtener más información acerca de la morfología de estos agregados micelares y conocer más a fondo a qué es debida la segunda CMC

observada, se han registrado imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de todas las metalomicelas preparadas a distintas concentraciones de tensioactivos. En la Figura 5.2 se muestran imágenes de todos los agregados micelares estudiados en esta tesis. Se observa claramente la formación de micelas esféricas a valores de concentración de tensioactivo superiores al primer valor de CMC. Además, se aprecia un cambio estructural en las micelas a concentraciones de tensioactivo mayores de CMC*, en el que las micelas esféricas alargan su estructura formando micelas cilíndricas o elipsoidales. Se observaron resultados similares para los cuatro metalosurfactantes estudiados. Todas las disoluciones mostraron una baja polidispersidad.

A partir de las imágenes de TEM realizadas, se han medido los diámetros de las distintas estructuras obtenidas. Con el fin de obtener valores estadísticamente fiables, se midió el tamaño de un número considerable de estructuras para así obtener un valor promedio del tamaño de cada tipo de micela. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** recoge los valores promedio de diámetro para las micelas esféricas, así como los valores promedios de la longitud y el ancho de las micelas elongadas. Los diámetros de las micelas esféricas apenas mostraron dependencia alguna con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Solo se observó una pequeña variación del diámetro con el número de cadenas alifáticas, siendo ligeramente más pequeña para las micelas formadas por tensioactivos de cadenas simples que para las micelas formadas por tensioactivos de cadenas dobles. Con respecto a las micelas elongadas, la longitud parece disminuir ligeramente con el tamaño de la cadena hidrocarbonada.

Tabla 5.2. Valor medio de los diámetros para las micelas esféricas (E) y cilíndricas o elongada (C).

	RuC11C11/nm		RuC1C11/nm		RuC19C19/nm		RuC1C19/nm	
N=20	E	C	E	C	E	C	E	C
Ancho/nm (diámetro)	20±4	21±3	15±4	20±6	20±5	20±7	17±3	21±9
Longitud/nm	----	45±6	----	44±10	----	38±6	----	40±5

N=número de nanoestructuras medidas para calcular el valor promedio.

Cambios en la estructura de agregados micelares han sido observados por otros autores en trabajos previos¹⁶. Según estos investigadores, una disposición más extendida de las cadenas hidrofóbicas del tensioactivo, como la que adquieren las moléculas anfifílicas en una micela elongada, va acompañada de un aumento de la concentración de contraiones en la interfase, lo que disminuye las repulsiones electrostáticas entre las cabezas cargadas. Esto disminuye la energía libre de agregación, lo que favorece la formación de las micelas alargadas.

Un cambio estructural similar fue observado para metalomicelas de Zn(II)¹⁷. En este caso, el descenso en la repulsión electrostática entre los grupos hidrofílicos de la cabeza del tensioactivo se atribuyó a una gran polarización del ion metálico en comparación con otros iones como Fe(II), Co(II) y Ni(II), lo que resulta en una mejor localización en la carga micelar. Un efecto de polarizabilidad del ion Ru(II) podría ser también la causa del cambio estructural observado en este trabajo.

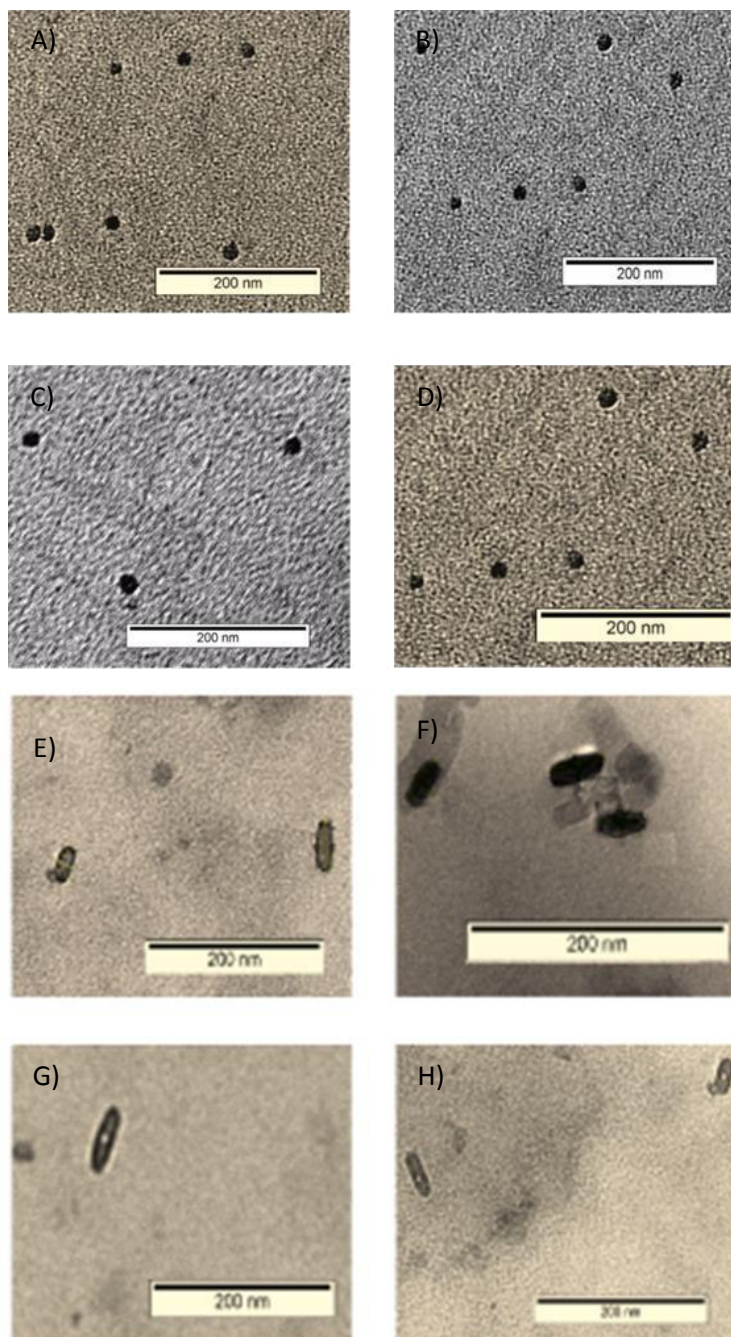
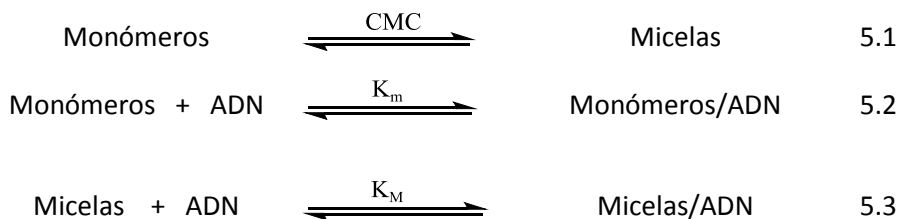


Figura 5.2. Imágenes de TEM de los dos tipos de agregados encontrados. Micelas esféricas: A) RuC11C11; B) RuC1C11; C) RuC19C19 y D) RuC1C19. Micelas elongadas: E) RuC11C11; F) RuC1C11; G) RuC19C19 y H) RuC1C19.

Una vez se conocen los aspectos estructurales de las metalomicelas de Ru(II) preparadas en esta tesis, se llevó a cabo un estudio de la interacción de estos agregados con ADN. Son muchos los trabajos encontrados en la bibliografía en los que tensioactivos de diversas características son capaces de encapsular moléculas de polinucleótidos para ser usados en transfección génica. Sin embargo, y quizás debido a que no se tiene aún muy claro los factores que influyen en la interacción tensioactivo/ADN, son pocos los investigadores que tratan de usar micelas como vectores no víricos para la encapsulación de estas biomoléculas. En esta tesis se ha investigado la interacción entre metalomicelas de Ru(II) y ADN. Para ello se comenzó cuantificando la influencia que ejerce el ácido nucleico en el autoensamblaje de las moléculas de los tensioactivos RuC1C11, RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19, para lo que se determinó la influencia de la concentración del polinucleótido sobre los valores de CMC y CMC*.

En la Figura 5.3 se muestra la dependencia de la CMC de la concentración de ADN. Los resultados demuestran que una mayor cantidad de tensioactivo es necesaria para formar micelas esféricas en presencia de determinadas concentraciones de polinucleótido. Al aumentar la cantidad de ADN en el medio aumentan las interacciones electrostáticas atractivas entre los grupos fosfatos del polinucleótido y las cabezas polares del tensioactivo, desplazándose el equilibrio del proceso (5.2) definido en el esquema 5.1-5.3 y, en consecuencia, el equilibrio (5.1) del mismo esquema.



Esquema 5.1-5.3: Equilibrios presentes en una disolución que contiene tensioactivo y ADN.

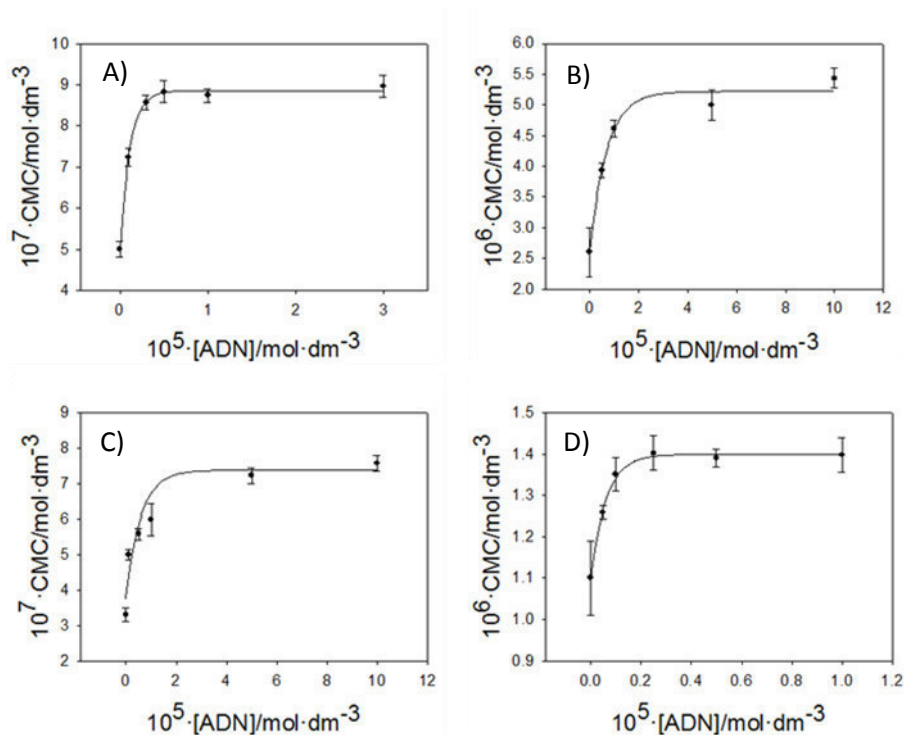


Figura 5.3. Estudio de la variación de la CMC con la concentración de polinucleotido para todos los metalosurfactantes sintetizados: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.

El valor constante de la CMC alcanzado a altas concentraciones de ADN puede explicarse comparando las constantes de equilibrio K_m y K_M representados en el esquema 5.1-5.3. Si la adición de ADN retira monómeros de tensioactivo de la disolución, se observaría un aumento progresivo del valor de la CMC con la concentración de ácido nucleico. Sin embargo, la CMC alcanza un valor constante a partir de una determinada concentración de ADN. Este hecho confirma que a partir de una determinada concentración de

polinucleótido, la interacción micela/ADN es más fuerte que la interacción monómero/ADN (en caso contrario el valor de CMC seguiría aumentando con la concentración de ADN). Es decir, el valor de K_M es mayor que K_m . A partir de una determinada concentración de polinucleótido, el aumento de cargas negativas debidas a los grupos fosfatos del ADN y la mayor carga positiva que soportan las micelas favorece la formación de micelas en la superficie de polinucleótido. El mayor valor de la constante de equilibrio K_M (ecuación 5.3 del esquema 5.1-5.3) desplaza el equilibrio monómeros \leftrightarrow micela (ecuación 5.1 del esquema 5.1-5.3) hacia el estado de productos (micelas), por lo que el valor de CMC tiene a un valor constante. El mismo comportamiento se obtuvo para todas las metalomicelas: RuC11C11, RuC1C11, RuC19C19 y RuC1C19.

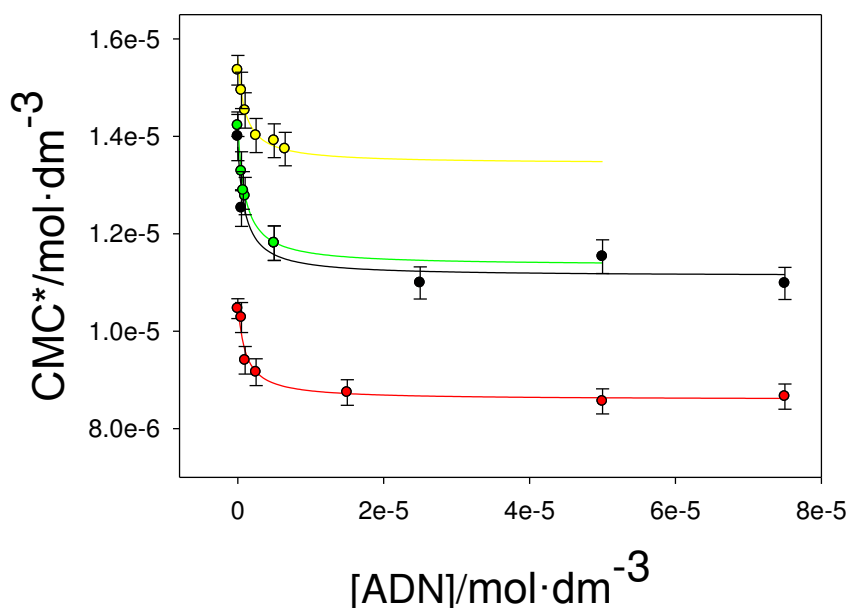


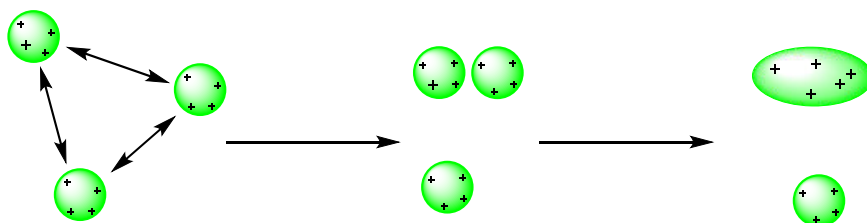
Figura 5.4. Variación de la CMC*(cambio estructural) con la adición de ADN.

● RuC11C11, ● RuC1C11, ● RuC19C19 y ● RuC1C19.

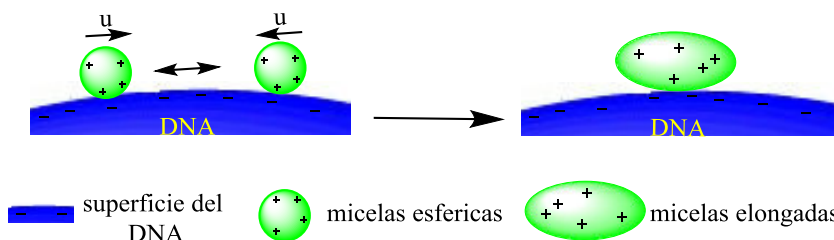
El estudio estructural se extendió también a la región de concentraciones de tensioactivos en la cual se observó un cambio estructural

de micelas esféricas a micelas elongadas. Así, se estudiaron los efectos de la presencia del ácido nucleico sobre el valor de la CMC*. Los resultados se muestran en la Figura 5.4. En esta figura se observa un comportamiento contrario al encontrado para la CMC. Se aprecia cómo el cambio conformacional del agregado formado se favorece en presencia del ácido nucleico. Este comportamiento se puede explicar si se considera que la unión de micelas al ADN tiene un carácter cooperativo, es decir, la presencia de una micela en la superficie del ADN favorece la presencia de una segunda micela y, así, sucesivamente. La formación de micelas elongadas en la superficie del ADN disminuye las repulsiones electrostáticas entre micelas esféricas, disminuyendo la energía libre del sistema y favoreciéndose el proceso de transición morfológica (ver Esquema 5.4).

A)



B)



Esquema 5.4. Transición de micelas esféricas a elongadas en: A) en disolución, B) en la superficie del polinucleótido.

Caracterizadas las micelas formadas por los metalosurfactantes RuC1C11, RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19 en presencia del polinucleótido, se procedió al estudio la interacción micela/ADN. Teniendo en cuenta que han

sido observadas dos tipos de micelas, esféricas y elongadas, comenzamos con el estudio de las micelas esféricas. El intervalo de concentraciones de tensioactivo en el que se forman las micelas esféricas es pequeño y la concentración de moléculas anfifílicas necesaria para la formación de micelas esféricas también es muy baja, por lo que se han encontrado muchas limitaciones experimentales para la realización de este estudio. Estas limitaciones son las responsables de que sólo se pudieran llevar a cabo medidas de emisión de fluorescencia con EtBr. La Figura 5.5. muestra los cambios en la intensidad de emisión del EtBr, en presencia de una concentración fija de ADN, cuando varía la concentración de micelas esféricas.

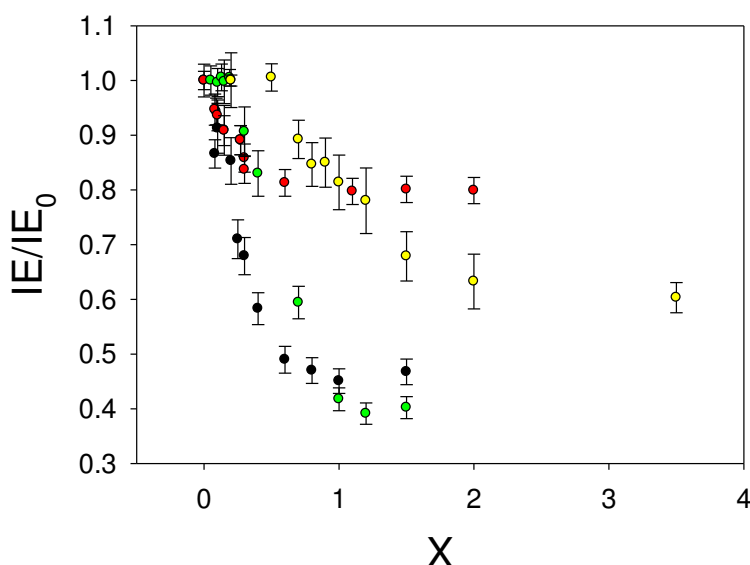


Figura 5.5. Intensidad de emisión relativa del bromuro de etidio en presencia de distintas relaciones molares $[\text{tensioactivo}]/[\text{ADN}]$, en sistemas micelares de micelas esféricas. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19.

En esta figura se observa cómo las metalomicelas formadas por los tensioactivos diméricos RuC11C11 y RuC19C19 desplazan la sonda hacia la disolución a concentraciones más bajas que las micelas formadas por los

tensioactivos de una sola cadena RuC1C11 y RuC1C19. Ambos tensioactivos diméricos se comportan de forma similar. Por el contrario, las micelas formadas por el tensioactivo RuC1C19 origina más cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia que las micelas formadas por el tensioactivo RuC1C11. Como se indicó con anterioridad, la variación de intensidad de emisión del bromuro de etidio puede relacionarse con cambios conformacionales que pueda sufrir el ADN. Se puede decir que las micelas esféricas de los tensioactivos con dos cadenas desplazan totalmente al EtBr desde su posición de intercalación entre pares de base del polinucleótido hacia la disolución. Por el contrario, el desplazamiento es menor para las micelas de tensioactivo monoméricos. Estos resultados podrían interpretarse diciendo que las micelas esféricas de los tensioactivos dímeros compactan totalmente al polinucleótido, mientras que en el caso de los tensioactivos con una sola cadena esta compactación sería parcial. Es difícil de explicar la influencia de la naturaleza del tensioactivo en los cambios mostrados en la Figura 5.5, aunque podrían estar relacionados con la influencia de las interacciones monómeros/ADN que estarían presentes.

A continuación se procedió al estudio de las interacciones micela/ADN en el intervalo de concentración de tensioactivo en el que se observó la formación de micelas elongadas. Como punto de partida, se llevó a cabo una experiencia con EtBr similar a la descrita anteriormente pero con una concentración de tensioactivo superior a la CMC*, es decir, se va a estudiar como varia la intensidad de emisión del EtBr en presencia de micelas elongadas a distintas concentraciones del tensioactivo (ver Figura 5.6). Se observó una disminución de la intensidad de emisión para todos los metalosurfactantes cuando aumenta [tensioactivo]. En este caso las micelas de RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19 parecen desplazar todas las moléculas EtBr hacia la disolución, mientras que las micelas RuC1C11 solo desplazan

aproximadamente el 80% de las moléculas EtBr. Esto podría explicarse asumiendo que las micelas elongadas de RuC1C11 sólo provocan un cambio conformacional parcial del polinucleótido. Estas diferencias, al igual que en el caso de las micelas esféricas, podrían estar relacionadas con la influencia de las interacciones monómeros/ADN.

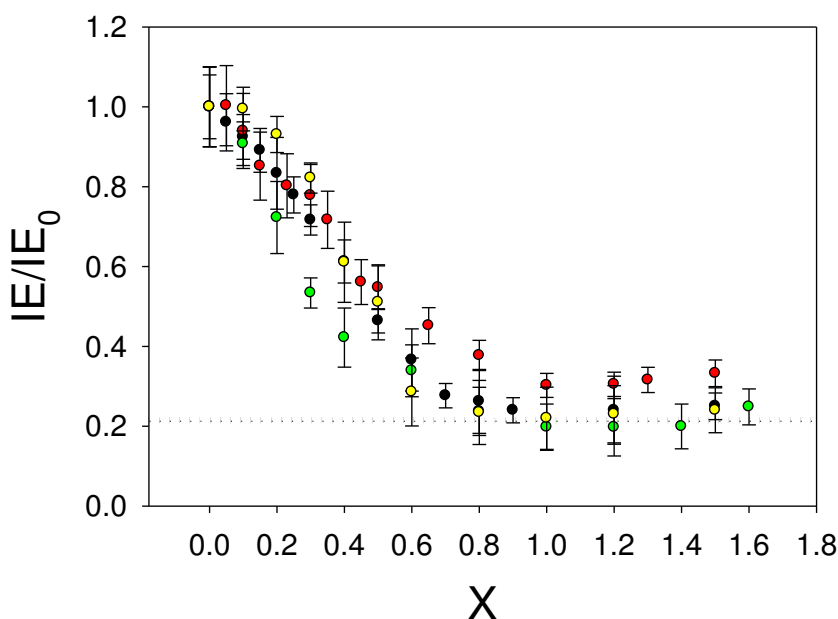


Figura 5.6. Intensidad de emisión relativa del bromuro de etidio a diferentes relaciones molares X , la concentración de tensioactivo se encuentra siempre por encima de la CMC*. La línea discontinua muestra la intensidad de emisión relativa del EtBr en ausencia de ADN. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19.

Las moléculas de EtBr intercaladas entre los pares de bases nitrogenados del ADN presentan una banda de absorción positiva inducida, localizada a 308 nm, en el espectro de dicroísmo circular (ver Figura 5.7). Sin embargo, la banda desaparece cuando las moléculas EtBr se encuentran en la disolución. Se estudió el comportamiento de dicha banda a diferentes valores de la relación molar X . Los resultados mostraron una disminución de la

elipticidad molar de EtBr a 308 nm conforme aumenta la relación molar X. Esta disminución es casi total, es decir, la banda prácticamente desaparece a valores grandes de X para todas las metalomicelas elongadas, excepto para las que se encuentran formadas por RuC1C11 (ver Figura 5.8.). Este hecho confirma que las metalomicelas formadas con RuC1C11 no producirían una modificación total de la conformación del polinucleótido, de acuerdo con lo observado a partir de los datos de fluorescencia.

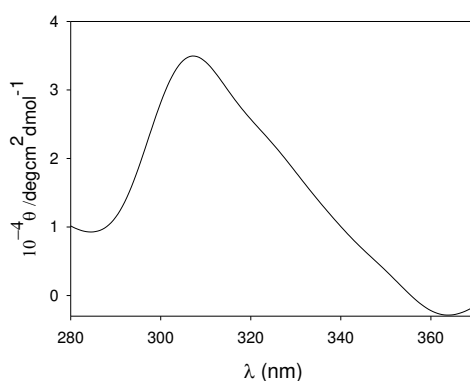


Figura 5.7. Espectro de dicroísmo circular del bromuro de etidio en presencia de ADN.

Los cambios conformacionales del ADN se podrían investigar estudiando la banda de dicroísmo circular que presenta este en su forma B-ADN, que es la estructura que presenta más comúnmente este ácido nucleico en disolución. Sin embargo, este espectro no pudo obtenerse con precisión en nuestras condiciones de trabajo debido a las bajas concentraciones de ADN utilizadas y a la baja solubilidad de los tensioactivos estudiados en esta tesis. Por otro lado, el hecho de que las metalomicelas de rutenio muestren una banda inducida en el mismo intervalo de longitudes de onda del espectro de dicroísmo circular del ADN supondría que los resultados obtenidos no fueran concluyentes.

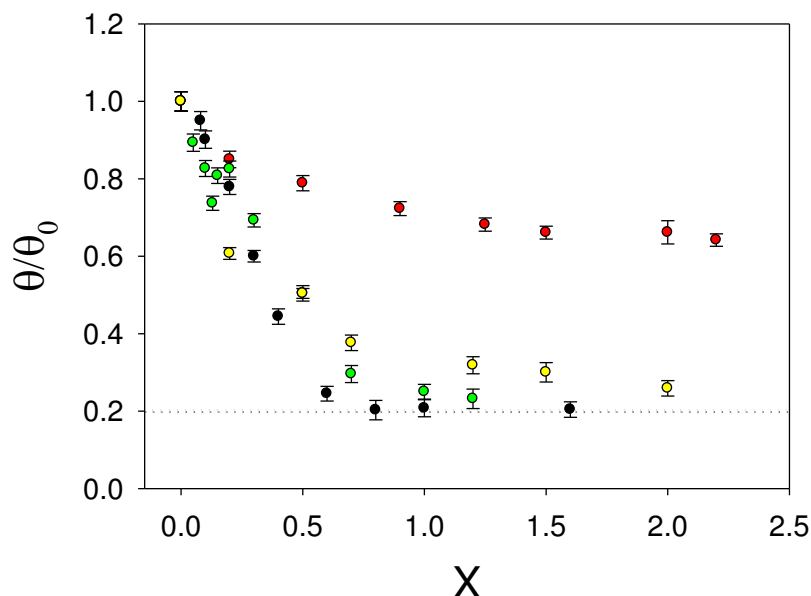


Figura 5.8. Variación de la elipticidad molar relativa del bromuro de etidio a diferentes relaciones molares X para concentraciones de tensioactivo por encima de la CMC*. La línea discontinua indica la intensidad de emisión relativa del EtBr en ausencia de ADN. () RuC1C11, () RuC1C11, () RuC19C19 y () RuC1C19.

Para visualizar si tiene lugar un proceso de condensación de las moléculas de ADN en presencia de las metalomicelas, se llevaron a cabo una serie de experiencias de microscopía de fuerza atómica. Se obtuvieron imágenes de AFM a diferentes valores de X (ver Figura 5.9). Se observó cómo el ADN cambiaba su conformación y sufría un proceso de condensación. En la Figura 5.9.A se observa la estructura de doble hélice alargada característica de la forma B del DNA. Las Figuras 5.9C y 5.9C confirman que las micelas de RuC1C19, RuC11C11 y RuC19C19 causan la compactación total del polinucleótido, mientras que la presencia de micelas de RuC1C11 solo produce una compactación parcial del mismo. Este resultado confirma la explicación dada a los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia y a la variación

de los espectros de dicroísmo circular observados cuando aumenta la concentración de tensioactivo,

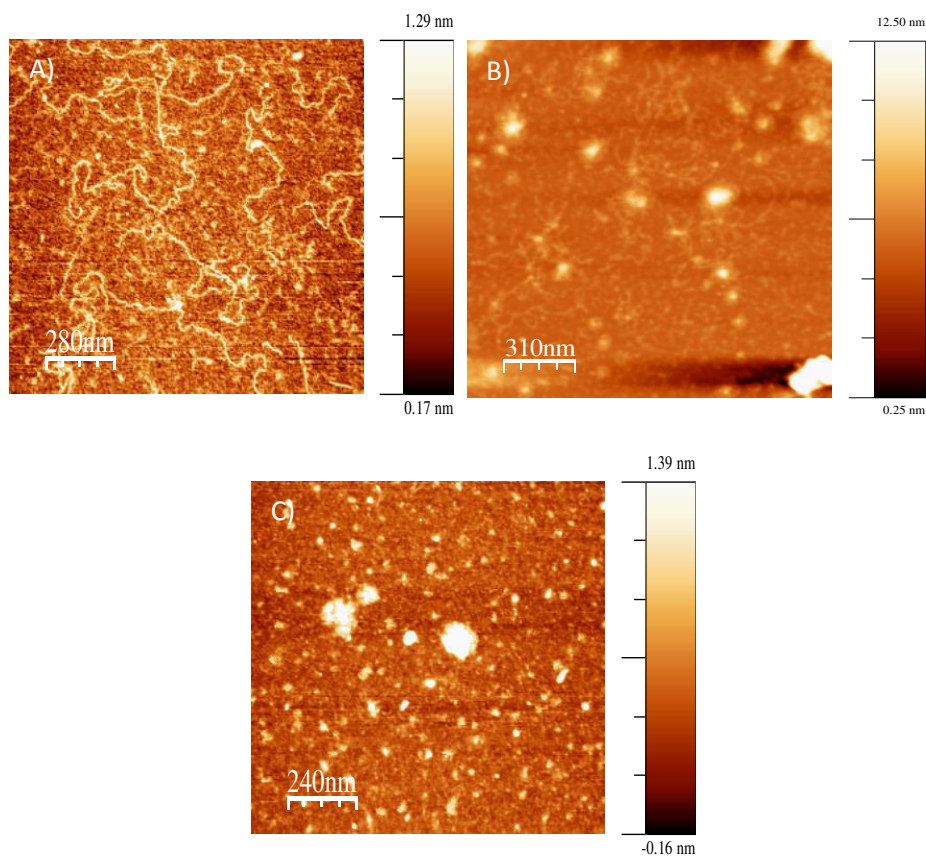


Figura 5.9. Imágenes topográficas por AFM del ADN en ausencia (A) y en presencia de RuC1C11 (B, $X=0.8$) y de RuC19C19 (C, $X=0.8$).

El potencial zeta está estrechamente relacionado con las características de las dobles capas eléctricas en las nanoestructuras estudiadas en esta tesis (ver apartado 2.2.6.). Para profundizar en el estudio de la interacción entre las metalomicelas de Ru y el ADN, se realizaron medidas del potencial zeta de disoluciones con diferentes relaciones molares X . La Figura 5.10. recoge los valores de los potenciales obtenidos en función de la relación molar X , a una concentración de ADN fija de $3.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, en un intervalo

de concentraciones de tensioactivo correspondiente a la formación de micelas elongadas.

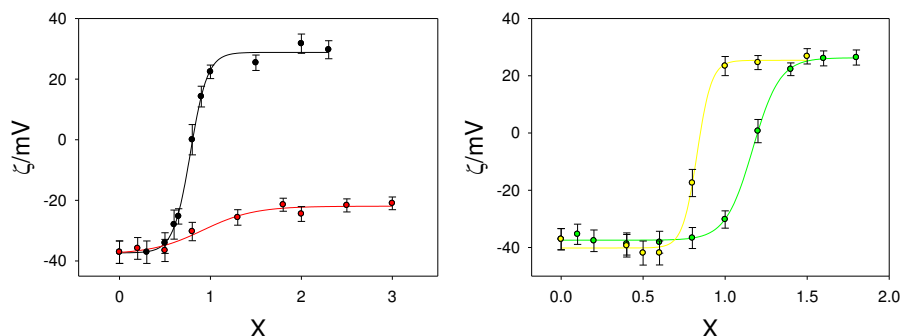


Figura 5.10. Variación de los valores de ζ frente a X, en la región de concentraciones de tensioactivo donde se forman micelas elongadas.

(●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19.

Como se puede observar en esta figura, en todos los casos se observa una dependencia sigmoideal de ζ con el valor X. Los valores de potencial zeta van desde un valor negativo de -40 mV, valor típico del ADN de timo de ternera en ausencia de metalomicelas, a un valor positivo de aproximadamente +30 mV tras la adiciones de micelas catiónicas de RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19. Por el contrario, no se observaron valores positivos de potencial zeta en todo el intervalo de X estudiado para las micelas formadas por RuC1C11. Teniendo en cuenta que la variación en el potencial zeta depende no solo de la relación de carga de los complejos tensioactivo/ADN, sino también de la conformación del polinucleótido, se puede concluir que las metalomicelas de RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19 son capaces de compactar totalmente las moléculas de ADN, mientras que las micelas de RuC1C11 solo provocan una condensación parcial de la biomolécula.

Los resultados de potencial zeta obtenidos suministran aún más información sobre la interacción micela/ADN. Como se puede ver en la Figura

5.10, se obtiene un valor cero para ζ a una relación molar X de aprox. 0,8 para las micelas formadas por RuC11C11 y RuC1C19 y a un valor X aproximado de 1.2 para RuC19C19. Por tanto, se necesita una mayor cantidad de tensioactivo de RuC19C19 para condensar el polinucleótido que el empleado con los tensioactivos RuC11C11 y RuC1C19. Para explicar este resultado recordaremos el estudio de caracterización de las metalomicelas realizados en este capítulo de tesis. Los tamaños de las micelas preparadas en este trabajo son muy similares, sólo ligeramente más pequeños para los tensioactivos de cadenas más largas RuC1C19 y RuC19C19 (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Teniendo esto en cuenta, se esperaría que el valor de potencial zeta cero se alcanzase a valores de X similares para todos aquellos tensioactivos que provocan cambio conformacional en el ADN. Las interacciones monómero/ADN podrían ser las responsables de los resultados obtenidos. A este respecto, se esperarían interacciones hidrofóbicas más fuertes para el RuC19C19 que para el RuC11C11. No obstante, las cadenas hidrofóbicas de 19 átomos de C podrían adoptar una conformación plegada, que disminuiría su contacto con la disolución acuosa. Esto resultaría en un comportamiento que correspondería a cadenas más cortas. Este hecho explicaría que la condensación del ADN ocurra a un valor mayor de X para el RuC19C19 que para el resto de metalosurfactantes, así como que el tamaño de las micelas de RuC19C19 sea ligeramente menor que el de las otras nanoestructuras.

También se obtuvo información adicional sobre las interacciones metalomicela/ADN mediante el uso de la técnica de electroforesis en gel de agarosa (Figura 5.11.). Las imágenes de electroforesis obtenida demuestran que hay migración de las moléculas de ADN para todos los valores de X estudiados para el sistema RuC1C11/ADN. Esto indicaría que el polinucleótido no sufre compactación en el rango de valores de X estudiados. Por el contrario,

la migración del ADN a través del gel sólo se observa para algunos valores X en la presencia del resto de micelas. Se confirman por tanto las conclusiones expuestas a partir de los resultados obtenidos con otras técnicas: las micelas RuC1C11 sólo compactan parcialmente el polinucleótido mientras que se observa una condensación total del ADN en presencia de las micelas RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19. Además, la ausencia de movimientos de bandas correspondientes a la migración del ADN se observa a valores de X más altos para las micelas de RuC19C19 que para las de RuC11C11 y RuC1C19, lo cual está de acuerdo con los resultados de potencial zeta observados.

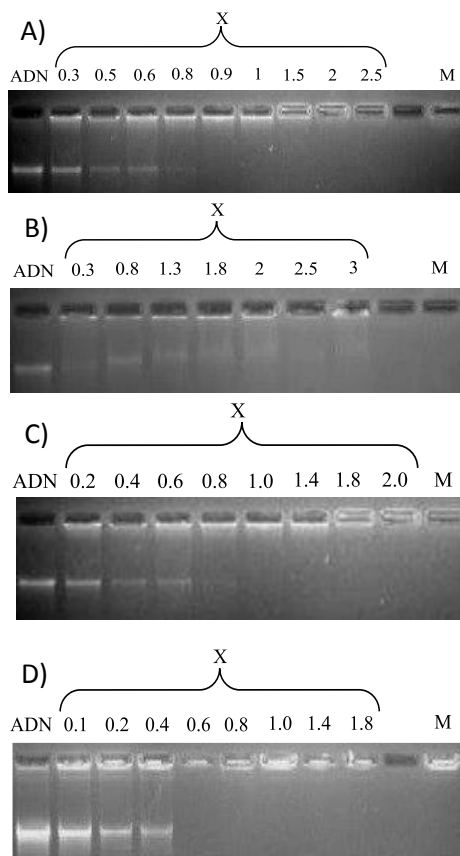


Figura 5.11. Imágenes de electroforesis de disoluciones de ADN ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) con distintas concentraciones de tensioactivos, siempre por encima de la CMC*. El pocillo M contenía una disolución micelar en ausencia de ADN. A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.

Como se ha mencionado anteriormente, no hay hasta la fecha muchos trabajos en la bibliografía que traten el estudio de la compactación del ADN mediante el uso de micelas, y aún menos mediante el uso de metalomicelas. En general, los investigadores suelen tener la idea de que no se llegan a formar micelas en presencia de ADN debido a la interacción entre los monómeros de tensioactivo y el polinucleótido. Nuestros resultados desmienten esta idea. No obstante, para la visualización de las micelas en presencia de ADN se han adquirido imágenes con un microscopio de fluorescencia confocal de

diferentes disoluciones micelares de RuC11C11 y RuC19C19 para distintos valores de la relación molar X . Las imágenes, recogidas en la Figura 5.12, muestran una distribución aleatoria de estas micelas en disolución (ver Figura 5.12. A) y D) para RuC11C11 y RuC19C19, respectivamente). Cuando se adiciona ADN a la disolución, a una relación de $X = 0.25$, las micelas (y los monómeros en la disolución) se localizan en la superficie del polinucleótido. Las Figura 5.12. B) y E) muestran claramente la estructura extendida que tiene el ADN a esta relación molar X . También se demuestra que el ADN está más condensado en presencia de RuC19C19 (Figura 5.12. E)) que en presencia de RuC11C11 (Figura 5.12. B)) para el mismo valor de X . Esto se podría deberse a las interacciones hidrofóbicas más fuertes (monómeros de RuC19C19/ADN). Las Figura 5.12. C) y F) muestran las imágenes de la estructura globular del polinucleótido a un valor X de 1,2, en el cual el ácido nucleico está totalmente condensado.

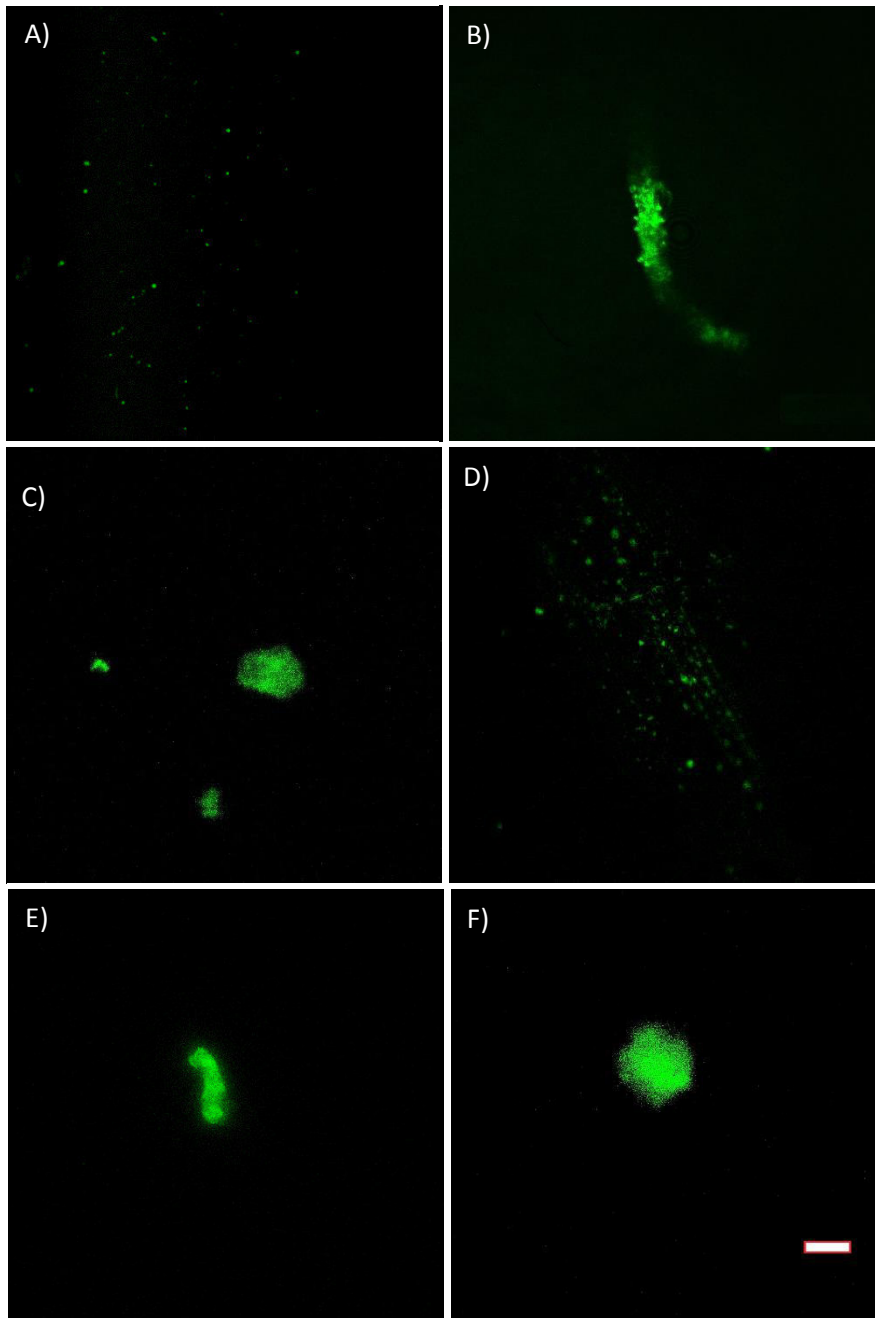


Figura 5.12. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal para el RuC11C11 (A $X=0$, B $X=0.25$, C $X=1.2$) y para RuC19C19 (D $X=0$, E $X=0.25$, F $X=1.2$) en presencia y ausencia de ADN con una escala de 5 μm .

5.3 Conclusiones

De los resultados que se han mostrado en este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los agregados de los metalosurfactantes RuC1C11, RuC11C11, RuC1C19 y RuC19C19 muestran dos estructuras diferentes: una esférica, a concentraciones pequeñas de tensioactivo, y otra elongada, a mayores concentraciones de las moléculas anfipáticas.
2. Tanto las micelas esféricas como las elongadas interaccionan con las moléculas de ADN.
3. Las micelas esféricas de RuC11C11 y RuC19C19 compactan completamente al polinucleótido, mientras que las micelas de RuC1C11 y RuC1C19 solo lo compactan parcialmente.
4. Todas las micelas elongadas condensan completamente al ADN menos las formadas por el tensioactivo RuC1C11, que sólo provoca una compactación parcial en el polinucleótido.
5. Los monómeros de tensioactivos presentes en todas las disoluciones micelares influyen, junto a las micelas, en la compactación del ácido nucleico.
6. Las disoluciones micelares de RuC19C19 necesitan más cantidad de tensioactivo que el resto para compactar el ADN. Esto podría deberse a que el tensioactivo adopta una conformación en la que las cadenas del tensioactivo están dobladas y se comportan como si su longitud fuera menor.

5.4 Bibliografía.

- (1) Mel'nikov, S. M.; Sergeyev, V. G.; Yoshikawa, K. Discrete Coil — Globule Transition of Large DNA Induced by Cationic Surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2401–2408.
- (2) Yulia S. Mel'nikova and Bjorn Lindman. PH-Controlled DNA Condensation in the Presence of Dodecyldimethylamine Oxide. *Langmuir* **2000**, *16*, 5871–5878.
- (3) Yang, X.; Jian, X.; Wang, J.; Zhang, H.; Jiang, F. Interaction of a Fluorescent Cationic Surfactant Bearing a Coumarin Derivative with DNA. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *462*, 170–178.
- (4) Garcia, J. P.; Marron, E.; Martin, V. I.; Moya, M. L.; Lopez-Cornejo, P. Conformational Changes of DNA in the Presence of 12-s-12 Gemini Surfactants (S=2 and 10). Role of the Spacer's Length in the Interaction Surfactant-Polynucleotide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *118*, 90–100.
- (5) Svens, B.; Rosenholm, B. An Investigation of the Size and Structure of the Micelles in Sodium Octanoate Solutions by Small-Angle X-Ray Scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **1973**, *44* (3), 495–504.
- (6) Reiss-Husson, F.; Luzzati, V. The Structure of the Micellar Solutions of Some Amphiphilic Compounds in Pure Water as Determined by Absolute Small-Angle X-Ray Scattering Techniques. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68* (12), 3504–3511.
- (7) Matsumura, Y.; Hamaguchi, T.; Ura, T.; Muro, K.; Yamada, Y.; Shimada, Y.; Shirao, K.; Okusaka, T.; Ueno, H.; Ikeda, M.; et al. Phase I Clinical Trial and Pharmacokinetic Evaluation of NK911, a Micelle-Encapsulated Doxorubicin. *Br. J. Cancer* **2004**, *91* (10), 1775–1781.

- (8) Fukushima, S.; Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kanayama, N.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated Polyplex Micelles from Triblock Cationomers with Spatially Ordered Layering of Condensed PDNA and Buffering Units for Enhanced Intracellular Gene Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 2810–2811.
- (9) Convertine, A. J.; Diab, C.; Prieve, M.; Paschal, A.; Hoffman, A. S.; Johnson, P. H.; Stayton, P. S. PH-Responsive Polymeric Micelle Carriers for siRNA Drugs. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (11), 2904–2911.
- (10) Wang, C.; Li, X.; Wettig, S. D.; Badea, I.; Foldvari, M.; Verrall, R. E. Investigation of Complexes Formed by Interaction of Cationic Gemini Surfactants with Deoxyribonucleic Acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (13), 1616–1628.
- (11) Rodik, R. V.; Klymchenko, A. S.; Jain, N.; Miroshnichenko, S. I.; Richert, L.; Kalchenko, V. I.; Mély, Y. Virus-Sized DNA Nanoparticles for Gene Delivery Based on Micelles of Cationic Calixarenes. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (20), 5526–5538.
- (12) Rodik, R. V.; Anthony, A. S.; Kalchenko, V. I.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. Cationic Amphiphilic Calixarenes to Compact DNA into Small Nanoparticles for Gene Delivery. *New J. Chem.* **2015**, *39* (3), 1654–1664.
- (13) Sharma, N. K.; Singh, M. Multifunctional Supramolecular Ionic Metallosurfactants (SMIMSs) for Antimicrobial, Anticancer and Serum Albumins Binding. *J. Mol. Liq.* **2018**, *263*, 463–471.
- (14) Wagay, T. A.; Ismail, K. Thermal, Aggregation, Counterion Binding, Light Scattering, and Adsorption Behavior of Cis-Chlorobis(Ethylenediamine)Dodecylaminecobalt(III) Perchlorate

- Metallosurfactant in Aqueous Sodium Perchlorate Medium. *Colloid Polym. Sci.* **2017**, 295 (9), 1685–1694.
- (15) Parodi, S.; Kendall, F.; Nicolini, C. A Clarification of the Complex Spectrum Observed with the Ultraviolet Circular Dichroism of Ethidium Bromide Bound to DNA. *Nucleic Acids Res.* **1975**, 2 (4), 477–486.
- (16) Chaudhuri, A.; Haldar, S.; Chattopadhyay, A. Structural Transition in Micelles: Novel Insight into Microenvironmental Changes in Polarity and Dynamics. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, 165 (4), 497–504.
- (17) Kaur, R.; Mehta, S. K. Metallomicelle Templated Transition Metal Nanostructures: Synthesis, Characterization, DFT Study and Catalytic Activity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19 (28), 18372–18382.

Capítulo 6º.

Metaloliposomas y su
interacción con ADN

Los medicamentos siempre se han utilizado para aumentar nuestra esperanza de vida y mejorar nuestra salud. Por regla general son muy efectivos cuando se emplean *in vitro* pero, cuando se aplica en pacientes, se ha demostrado que, en muchos casos, actúan de forma indiscriminada en diversos tejidos y órganos, tanto dañados como sanos, provocando en muchos casos serios efectos secundarios en los pacientes¹. Por esta causa, su uso ha empezado a cambiar en este último siglo con el empleo de moléculas (nanotransportadores) que pueden facilitar el transporte del medicamento². Como se mencionó anteriormente, cuando el fármaco utilizado es material genético los nanotransportadores se denominan vectores. Los vectores pueden ser víricos o no víricos. Son éstos últimos los que más se utilizan a día de hoy debido a que los vectores virales tienen asociado unos efectos secundarios que pueden ser perjudiciales para la salud del paciente.³ Además del transporte del medicamento, es importante que el sistema de entrega sea ideal, con el fin de asegurar que el complejo medicamento/nanotransportador alcance y actúe en los objetivos diana.

El uso de liposomas como vehículo de transporte de fármacos está ganando una aceptación clínica considerable. Esto es debido a la disminución de los efectos secundarios que los fármacos provocan cuando se usan encapsulados por estas nanoestructuras. Así, por ejemplo, se ha demostrado cómo la cardiotoxicidad que provoca un agente antineoplásico llamado doxorubicina se reduce de forma significativa cuando se encuentra encapsulado en liposomas⁴⁻⁷.

La terapia génica consiste en el tratamiento de enfermedades utilizando genes recombinantes, con efectos terapéuticos, y que supone insertar información genética en la célula. Un gen recombinante se define como un fragmento de ADN modificado en el laboratorio⁸. Hoy en día se han llevado a cabo algunas investigaciones sobre terapia génica como una opción

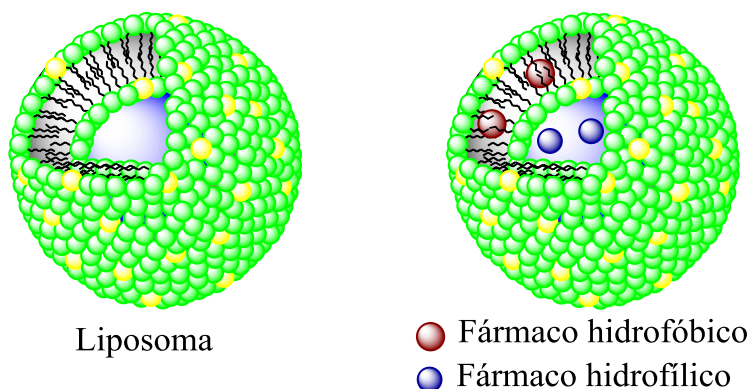
prometedora para tratar numerosas enfermedades adquiridas como el cáncer^{9,10}, el SIDA¹¹ o enfermedades hereditarias como desordenes genéticos¹². Por tanto, la terapia génica puede considerarse como una terapia avanzada, que puede ofrecer nuevas y diferentes estrategias para afrontar enfermedades que no tienen un tratamiento efectivo. Así, en 2006 Yanzhang Wei y colaboradores¹³ trataron de manera exitosa un melanoma metastásico en dos pacientes diferentes. Posteriormente 2014 se consiguieron reducir los efectos de la Choroideremia, CHM, (enfermedad que afecta a las corneas de los paciente, es una enfermedad genética en el cromosoma X) mediante el empleo de terapia génica¹⁴, dotando a los pacientes de una mayor agudeza visual. Otros logros Salima Hacein-Bey Abina¹⁵ y colaboradores publicaron en 2015 los resultados del tratamiento de células madres mediante terapia génica para curar el síndrome de Wiskott-Aldrich (se caracteriza por presentar infecciones recurrentes, eczema, y disminución del número de plaquetas en sangre (trombocitopenia) que provocan mayor tendencia al sangrado) de 7 pacientes de los cuales 6 vieron reducido los síntomas drásticamente. Estos son algunos de los ejemplos de los más de 2600 casos en los que se ha aplicado la terapia génica para tratar diferentes enfermedades¹⁶. Aun así más del 64.4% de los estudios sobre terapia génica se llevan a cabo para combatir el cáncer².

El objetivo final de la terapia génica es modular la expresión de algunas proteínas modificadas mediante la transfección de nuevo material genético en el núcleo de las células humanas, consiguiendo un beneficio al individuo¹⁷. En cualquier caso, una enfermedad sólo puede ser tratada con terapia génica cuando se conoce bien tanto la fisiopatología del gen, como el vector que vaya a ser usado.

Cuando material genético es transportado al interior de una célula diana (objetivo) debe resistir los mecanismos de defensa biológica. Por lo tanto, el éxito de la terapia génica depende de un vector de transporte

eficiente, que permita la entrada del gen exógeno a la célula, permitiendo su entrada y alcanzado una buena biodisponibilidad intracelular¹⁸. Hay muchas moléculas que pueden actuar como vectores no virales. Así, por ejemplo, nanopartículas¹⁹⁻²¹, calixarenos^{22,23}, ciclodextrinas²⁴⁻²⁶ o liposomas²⁷⁻²⁹, son algunos de los más utilizados.

Los liposomas tienen una estructura similar a la de las vesículas, es decir, son agregados esféricos que están constituidos por una bicapa lipídica que separa el interior del agregado del disolvente (las características de estas estructuras se describieron en la introducción general de esta tesis). La estructura de los liposomas (ver Esquema 6.1) presenta una zona apolar (la bicapa lipídica) y otra polar (el interior acuoso del liposoma). Los liposomas catiónicos son los más usados en terapia génica. Su carga positiva, además de su carácter anfipático, aumenta su capacidad para atravesar las membranas celulares y las barreras lipídicas. Además, se pueden construir lipomas no tóxicos, biodegradables y biocompatibles (dependiendo del fosfolípido utilizado)³⁰.



Esquema 6.1. Estructura de un liposoma catiónico como vector de medicamentos polares y apolares.

En este capítulo centraremos el estudio en el empleo de liposomas catiónicos como vectores. Los liposomas empleados son liposomas unilamelares mixtos constituidos por un tensioactivo catiónico y un lípido auxiliar. Los tensioactivos catiónicos empleados han sido los metalosurfactantes derivados del complejo inorgánico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, RuC11C11 y RuC19C19. El lípido auxiliar utilizado ha sido el 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), que es una especie zwitteriónica que presenta una carga global cero a pH fisiológico.

Además de preparar los liposomas catiónicos, se ha realizado la caracterización estructural y fisicoquímica de dichos vectores; y se ha estudiado la formación de complejos liposoma/ADN (complejos llamados lipoplejos)³¹ para intentar establecer una relación entre las características del metalosurfactante incorporado en la estructura del liposoma y el poder de encapsulación de la información genética.

6.1 Parte experimental.

6.1.1 Preparación de lipoplejos.

La preparación de lipoplejos se divide en tres pasos. Esta división se adapta también a periodos de espera que requiere tal preparación. Es muy importante conocer la composición del lipoplejo porque de ello dependen los cálculos necesarios para preparar las membranas.

6.1.1.1 Preparación de la membrana (bicapa lipídica)

En primer lugar, se pesa la cantidad necesaria de tensioactivo catiónico y se disuelve en 2 mL de cloroformo. Se prepara una disolución de DOPE en las mismas condiciones. Las disoluciones se agitan durante unos segundos en un vórtex a 1200 revoluciones. Las cantidades de tensioactivo y de lípido pesadas son las necesarias para obtener la membrana, cuya composición viene dada por la fracción molar α :

$$\alpha = \frac{\text{mol } T^+}{\text{mol } T^+ + \text{mol } DOPE} \quad 6.1$$

$$T^+ \equiv \text{RuC11C11 o RuC19C19}$$

Se añaden 400 μL de cada disolución en un eppendorf y la mezcla se somete a un proceso de agitación con ultrasonidos durante 2 minutos. A continuación, los eppendorf se colocan abiertos en una centrifugadora evaporadora en modo V-HV a 303 K durante 50 minutos. Con este proceso eliminamos por evaporación el cloroformo, quedando una fina película en el

fondo de la pared del vial que se conserva en una cámara frigorífica a una temperatura de 193 K. Gracias a este almacenamiento las propiedades de las membranas se mantienen íntegras hasta su utilización.

6.1.1.2 Hidratación de las membranas (*preparación de liposomas*)

Transcurrido un mínimo de 24 horas, se hidratan las membranas con 2 mL de tampón HEPES 10 mM, a pH=7.4. Se somete la disolución contenida en el eppendorf a un proceso de 10 ciclos alternados de vórtex (3 minutos) y ultrasonido (2 minutos). Una vez terminados los ciclos se mantiene la muestra en agitación en vórtex durante 2 horas.

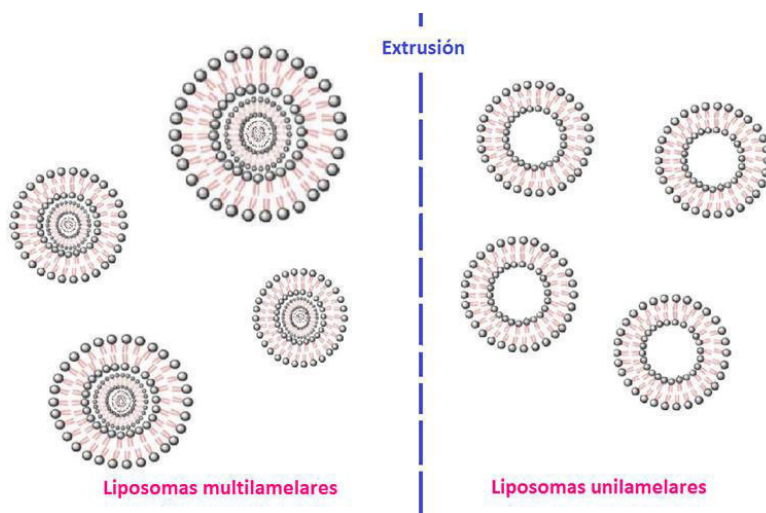


Esquema 6.2. Fotografías del extrusor manual usado

Los liposomas que se obtienen con este procedimiento son multilamelares y poseen una distribución de tamaños muy heterogénea (ver Esquema 6.3). Para obtener liposomas unilamelares y reducir su polidispersidad se somete la muestra a un proceso de extrusión (ver Esquema 6.2), que consiste en hacer pasar la disolución que contiene las vesículas multilamelares a través de un orificio pequeño para dispersar los componentes de las nanoestructuras. En este proceso de extrusión la disolución pasa también por un filtro de tamaño de poro pequeño (100 nm en este caso). Este proceso se repite unas 10 veces para conseguir obtener liposomas

unilamelares todos ellos con tamaños parecidos, de manera que la polidispersidad sea lo más pequeña posible.

La disolución resultante que contiene liposomas unilamelares se guarda en un frigorífico a una temperatura comprendida entre los 2 y 4 °C, durante unas 24 horas, para su completa estabilización.



Esquema 6.3. Representación gráfica a nivel molecular del proceso de extrusión

6.1.1.2 Preparación de lipoplejos.

La composición de un lipoplejo (complejo formado por liposomas y ADN) viene dada por la relación de masas L/D, la cual se encuentra definida en la ecuación 2.

$$\frac{L}{D} = \frac{\text{masa total de lípidos}}{\text{masa ADN}} = \frac{\text{masa DOPE} + \text{masa } T^{+}}{\text{masa ADN}} \quad 6.2$$

La masa de ADN se mantiene constante e igual a 10^{-4} g.

Un valor característico de la relación L/D para estos sistemas es el valor de electroneutralidad, en el que las cargas positivas y negativas se compensan, resultando un lipoplejo neutro. Para este valor de L/D, la carga efectiva (z_{eff}), que se define como la relación de moles de carga (ecuación 3), ha de ser igual a la unidad.

$$z_{eff} = \frac{mol\ T^{+} \times q_{T+}}{mol\ ADN \times q_{ADN}} \quad 6.3$$

Tabla 6.1. Valores teóricos de la relación L/D, correspondientes al punto de electroneutralidad, para los diferentes liposomas preparados según la composición α .

α	L/D Para $z_{eff}=1$	
	RuC11C11	RuC19C19
0.2	6.4	6.7
0.4	3.3	3.7
0.5	2.7	3.1
0.6	2.3	2.7
0.7	2.0	2.4
0.8	1.8	2.2

La Tabla 6.1 muestra los valores de la relación L/D que corresponde al punto de electroneutralidad para diferentes valores de α (ecuación 1). Para cada composición se estudió un intervalo de valores de L/D por debajo y por encima del punto de electroneutralidad. Para ello, preparamos disoluciones con distintos valores de L/D (ecuación 2), es decir, disoluciones con distintas concentraciones de liposoma y con una concentración de ADN constante ($1.60 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Además, se prepararon dos disoluciones, una que sólo contendrá el liposoma y otra con sólo el ADN, que servirán de referencia.

6.1.2 Preparación de disoluciones.

Todas las experiencias se han realizado a un valor constante de pH de 7.4, obtenido con una disolución tamponada de HEPES 10 mM, y a una temperatura de 298.0 ± 0.1 K.

Como se ha comentado anteriormente, se prepararon disoluciones con múltiples valores de L/D y α .

Hay que indicar que el orden de adición de las distintas especies a mezclar es importante en la preparación de los lipoplejos, ya que un orden equivocado podía llevar a la precipitación del sistema. El orden de mezclado fue el siguiente:

- 1- Se añade en un eppendorf el volumen de ADN que contiene un peso de 10^{-4} g.
- 2- A continuación se añade el volumen necesario de disolución tamponada, y se agita la disolución.
- 3- Se adiciona el volumen de disolución de liposomas que permita obtener los diferentes valores de L/D que se quieren estudiar.

Siguiendo este orden de preparación de los lipoplejos, sólo precipitaron aquellas disoluciones con valores de L/D muy cercanas al de electroneutralidad. Cuando el orden de mezclado era diferente, casi todas las disoluciones precipitaban.

6.2 Resultados y discusión.

En primer lugar se realizó un estudio de caracterización de los liposomas sintetizados para los tensioactivos RuC11C11 y RuC19C19 a diferentes valores de α . Para ello se obtuvo el tamaño de los liposomas mediante el uso de la técnica de dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS). Los valores del diámetro de las nanoestructuras se recogen en la Figura 6.1.

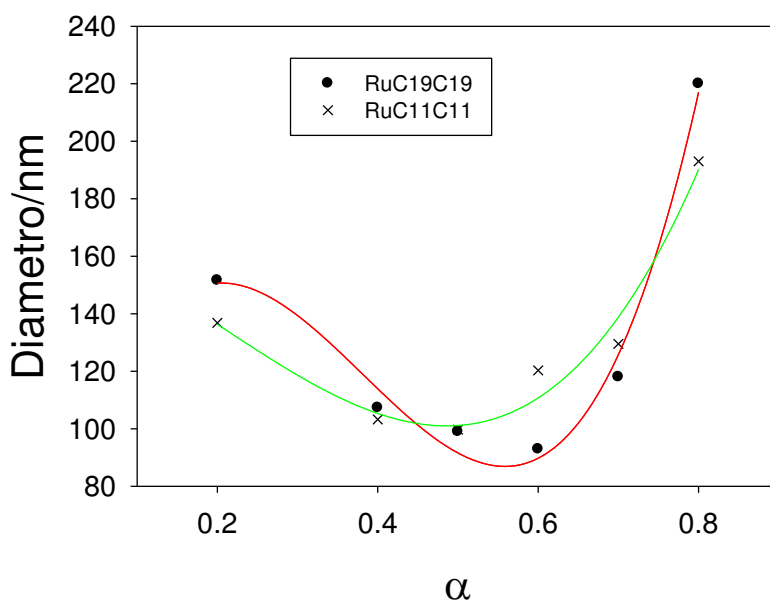


Figura 6.1. Variación del tamaño de los liposomas con respecto al valor del parámetro α , es decir, conforme varía la composición de los mismos.

Como se puede observar, la variación del tamaño de los dos tipos de liposomas preparados es muy similar. Se aprecia inicialmente una bajada del tamaño conforme aumenta la proporción de tensioactivo catiónico en los liposomas y, tras alcanzar un valor mínimo, el tamaño aumenta hasta valores

elevados. Esta variación en el tamaño del liposoma con el parámetro α puede explicarse en base a las interacciones que intervienen en la formación del agregado. Así, el carácter hidrofóbico del metallosurfactante favorece las interacciones entre las colas hidrocarbonadas de los lípidos, disminuyendo el tamaño del liposoma. Por otro lado, las repulsiones entre las cabezas polares catiónicas del tensioactivo causarían un aumento en tamaño. Teniendo en mente la definición del parámetro $\alpha, \frac{mol T^+}{mol T^+ + mol DOPE}$, un aumento del mismo se refleja en un aumento de la cantidad de tensioactivo en el liposoma respecto a la cantidad de lípido total. A valores bajos del parámetro α , la contribución de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (tensioactivo y lípido) prevalecen sobre las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares del tensioactivo. La disminución de tamaño del liposoma al añadir más cantidad de tensioactivo, a una cantidad constante de DOPE, disminuye el tamaño del liposoma, lo que parece indicar que las interacciones hidrofóbicas tensioactivo/DOPE son más fuertes que las interacciones tensioactivo/tensioactivo o DOPE/DOPE. Al aumentar aún más la cantidad de tensioactivo añadida al sistema aumenta la carga superficial del liposoma, por lo que aumentarán las interacciones electrostáticas repulsivas entre las cabezas polares del tensioactivo y, en consecuencia, el tamaño del liposoma. Por tanto, a partir de un determinado valor de dicho parámetro son las interacciones electrostáticas las que más contribuyen en la estructura del liposoma. El valor del tamaño mínimo corresponderá al tamaño del liposoma para el cual las dos contribuciones se compensan.

Esta conclusión encuentra fundamento cuando comparamos los resultados obtenidos para los dos metallosurfactantes utilizados (RuC11C11 y RUC19C19), que presentan la misma cabeza polar pero diferente longitud de cadena. Al comparar los tensioactivos, las interacciones hidrofóbicas serán

más fuertes en el caso del RuC19C19 que en el caso del RuC11C11. Por tanto, se requerirá una mayor repulsión entre las cabezas hidrofílicas del tensioactivo RuC19C19 o lo que es lo mismo, una mayor cantidad de tensioactivo, para compensar esta diferencia. Esto explica que el valor mínimo en tamaño para el liposoma que contiene el tensioactivo RuC19C19 se encuentre a valores de α más altos.

La finalidad de la preparación de los liposomas descritos es usarlos como vectores para la condensación de ADN. A continuación, se presenta la caracterización de los lipoplejos construidos para distintos valores de α . Estos estudios se llevaron a cabo a distintos L/D, manteniendo constante la concentración de ADN y la composición de los liposomas.

Con el fin de obtener información sobre la interacción del ADN con los liposomas realizamos un estudio fotofísico del sistema, para lo que nos apoyamos en las propiedades de los metalosurfactantes. Las técnicas que se van a emplear para la realización de este estudio son espectrometría UV-visible y fluorescencia.

La Figura 6.2 muestra la variación de la absorbancia del sistema a diferentes valores de L/D. Los resultados obtenidos indican que existe interacción entre los liposomas y el ADN, formándose lo que se denominan lipoplejos. Esta interacción se ve reflejada en una disminución en la absorción del lipoplejo conforme aumenta el valor L/D, hasta un valor límite a partir del cual no se aprecia variación.

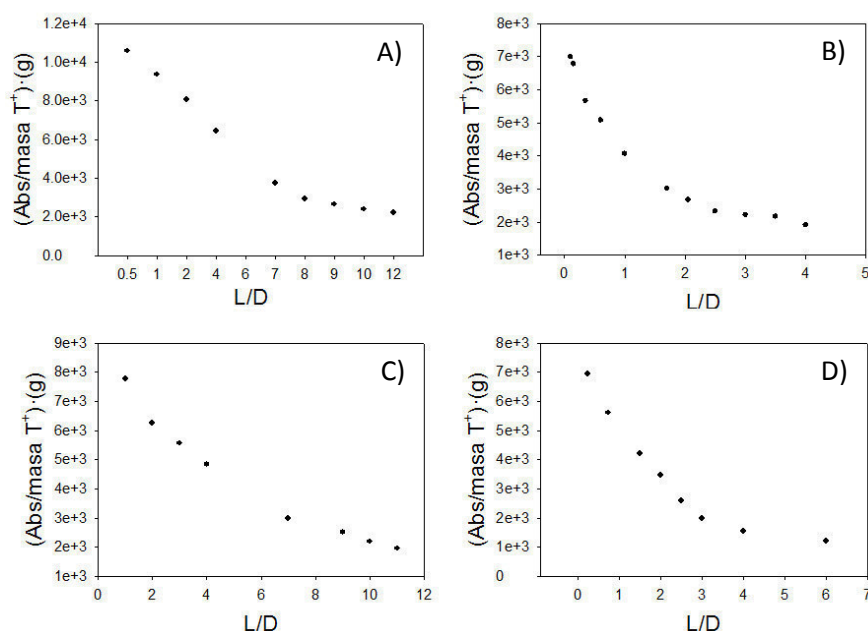


Figura 6.2. Ejemplos de la variación de la absorbancia del lipoplejo ($\lambda = 456 \text{ nm}$) a diferentes valores de L/D, para diferentes α . Para RuC11C11; A) $\alpha = 0.2$ y B) $\alpha = 0.8$ y para RuC19C19; C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.8$.

La Figura 6.3 muestra la variación de la intensidad de emisión a la longitud de onda correspondiente al máximo, 617 nm, al variar la masa de lípido total para distintos sistemas liposomiales. Como podemos ver a medida que se va aumentando la masa de lípido total (que es proporcional al valor de L/D) se aprecia una disminución en la intensidad de emisión del lipoplejo. Estos resultados indicarían la existencia de interacciones liposoma/ADN; esto es, la formación del lipoplejo.

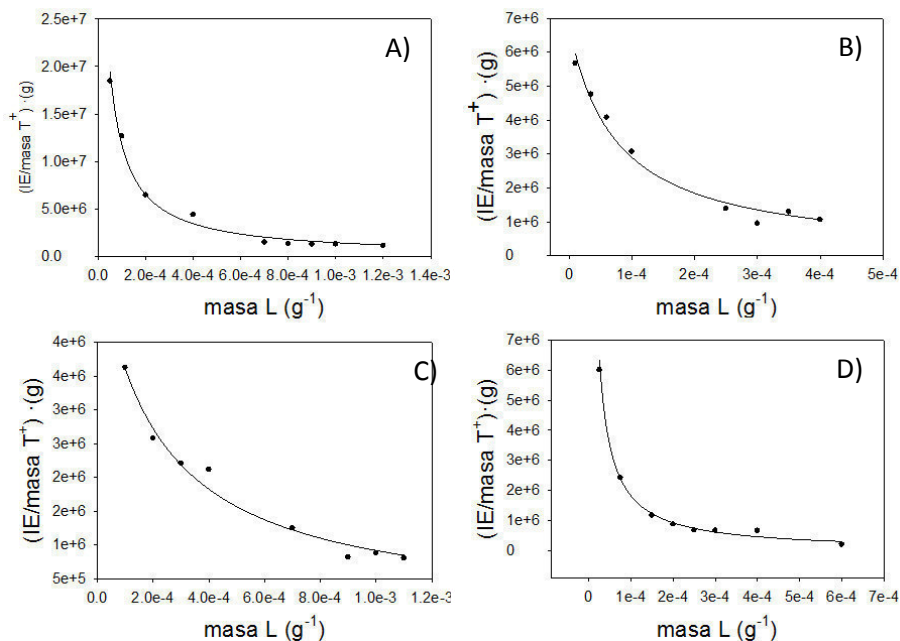
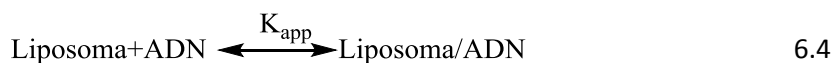


Figura 6.3. Ejemplos de la variación de la intensidad de emisión relativa a la masa de tensioactivo catiónico del lipoplejo ($\lambda=617$ nm) a diferentes valores de L/D y α , al aumentar la masa total de lípido. Para RuC11C11; A) $\alpha=0.2$ y B) $\alpha=0.8$ y para RuC19C19; C) $\alpha=0.2$ y D) $\alpha=0.8$.

A continuación se va a realizar un estudio cuantitativo de la interacción entre el ADN y el liposoma. Para ello se hará uso del modelo de dos estados o de pseudofase. Para la aplicación de este modelo se requiere la distribución de una especie entre dos fases distintas. En nuestro caso hablaremos del (L_f) liposomas libre (en el seno de la disolución) y de (L_b) lipoplejo (liposoma unido al ADN). El equilibrio del cual queremos determinar la constante aparente de unión es:



A partir de los datos obtenidos y empleando la ecuación del modelo de pseudofase³²(ecuación 6.5), se pueden obtener las constantes aparentes de unión para el equilibrio descrito (ecuación 6.4).

$$IE = \frac{IE_{free} + IE_{bound}K_{app}[Liposoma]}{1 + K_{app}[Liposoma]} \quad 6.5$$

Donde IE es la intensidad de emisión observada, IE_{free} y IE_{bound} son las intensidades de emisión de los liposomas sin y con el ADN incorporado, respectivamente, y K_{app} es la constante aparente de formación del complejo liposoma/ADN.

En la Figura 6.3 se pueden observar algunos ejemplos de los ajustes obtenidos, para distintos valores de α (la línea sólida de la Figura 6.3), para ambos tensioactivos. Las constantes aparentes de unión obtenidas se recogen en la Figura 6.4.

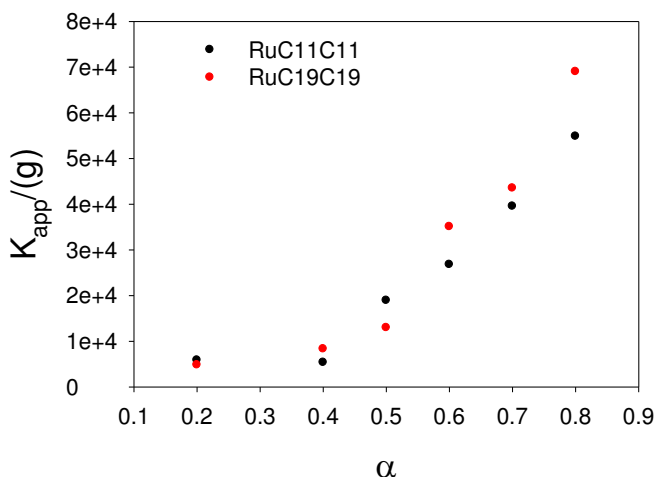


Figura 6.4. Dependencia de las constantes aparentes de formación del lipoplejo, obtenidas a partir de datos de fluorescencia, del valor de α .

Como se puede observar al aumentar el valor de α también se produce un incremento en el valor de las constantes. Este resultado está de acuerdo con lo esperado, ya que, un aumento en α supone un aumento en la proporción del tensioactivo catiónico, lo que implica una mayor carga positiva de los liposomas que tendrán una mayor afinidad por las moléculas de ADN negativamente cargadas.

Una vez estudiada la interacción entre los liposomas y el ADN se procede a estudiar la carga del lipoplejo. Para realizar este estudio se utilizaron medidas de potencial Zeta. Estas medidas se han realizado a diferentes L/D, fijando la concentración de polinucleotido y la composición de los liposomas (α). Los resultados se recogen en la Figura 6.5. Este estudio es importante ya que si se quiere conseguir lipoplejos aptos para su uso como vectores en terapia génica, se requiere que tengan una carga positiva para poder atravesar las membranas de las células.

Tal como se ha descrito existe un valor de L/D característico de cada sistema liposoma-ADN donde Z_{eff} es igual a 1, donde las cargas están compensadas. En la Tabla 6.1 se muestran los valores teóricos de L/D de electroneutralidad para nuestros sistemas. La Figura 6.5 muestra un comportamiento sigmoide y una inversión de carga para todos los sistemas investigados. Los valores experimentales de L/D donde Z_{eff} es igual a 1 son semejantes a los calculados, aunque algo más altos, y se muestran en la Tabla 6.2. también se muestran resultados obtenidos por otro método que se describirá más tarde. La discrepancia puede deberse a que las cargas efectivas del tensioactivo no correspondan exactamente a las que se han tenido en cuenta para la realización de los cálculos teóricos. Para investigar este punto se determinó la carga aparente de los tensioactivos a partir de los datos de L/D donde se ha alcanzado la electroneutralidad. Hay que tener en cuenta que se conocen las cantidades de lípido catiónico (metalosurfactante) y de

polinucleotido, así como la carga del ADN utilizado que vale -2 por pares de bases. En la Tabla 6.3 se muestran los valores de la carga de los tensioactivos para los distintos α . Como era de esperar la carga es la misma para todas las composiciones, dentro de los errores experimentales, y muy cercana a +2.

Tabla 6.2. Valores de L/D de electroneutralidad experimentales obtenidos a partir de medidas de potencial Zeta para los diferentes α .

α	L/D obtenidos a partir de datos de Pz		L/D obtenidos a partir de datos de tamaño	
	RuC11C11	RuC19C19	RuC11C11	RuC19C19
0.2	6.76	7.11	6.54	7.50
0.4	3.78	3.79	3.42	3.81
0.5	3.00	3.25	2.92	3.48
0.6	2.35	3.01	2.72	2.93
0.7	2.16	2.63	2.29	2.54
0.8	1.91	2.21	1.98	2.41

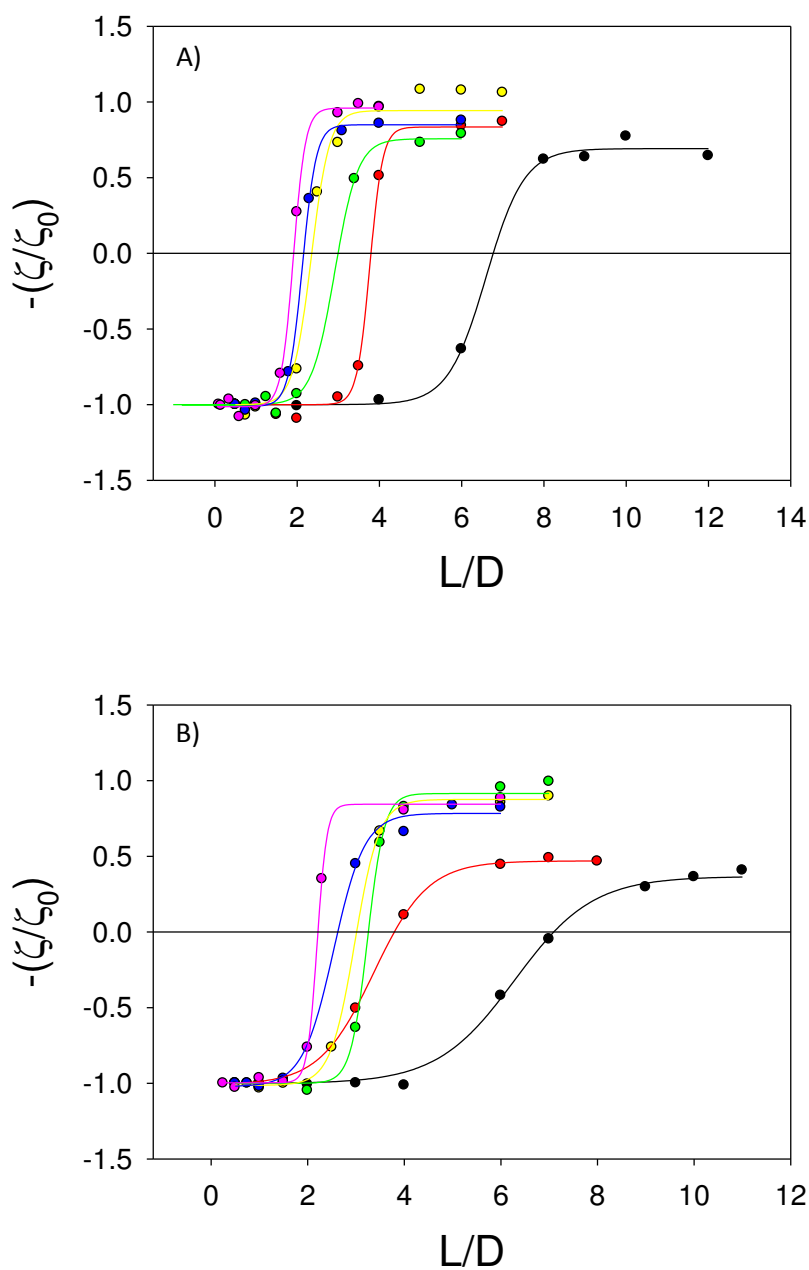


Figura 6.5. Representación del potencial Zeta en orden creciente de L/D, donde: (●) $\alpha=0.2$, (●) $\alpha=0.4$, (●) $\alpha=0.5$, (●) $\alpha=0.6$, (●) $\alpha=0.7$ y (●) $\alpha=0.8$ para A) RuC11C11 y B) RuC19C19

Otra propiedad muy importante para el tratamiento de enfermedades mediante la terapia génica es en tamaño del complejo vector/ADN. Información sobre el tamaño de los lipoplejos se ha obtenido por DLS. Los resultados se muestran en la Figura 6.6. Se observa una uniformidad de tamaño a valores de L/D pequeños y grandes. Por el contrario, se produce un aumento brusco del mismo a valores de L/D coincidentes con el punto de electroneutralidad ($\zeta=0$). Este comportamiento se puede explicar si se considera que a valores bajos de L/D los lipoplejos presentan carga negativa, esto hace que el sistema sea estable y los complejos no tiendan a la agregación debido a las repulsiones electrostáticas. Al ir aumentando la cantidad de lípidos en el sistema, L/D, la carga negativa va disminuyendo debido a que el liposoma tiene carga positiva. Cuando el lipoplejo alcanza un valor de potencial Zeta cercano o igual a cero, no hay repulsiones electrostáticas y los lipoplejos se agregan. Este hecho provoca un aumento del tamaño de los mismos. Al aumentar aún más la relación L/D, el complejo liposoma/ADN vuelve a adquirir carga, aunque en este caso es positiva, lo que aumenta de nuevo las repulsiones electrostáticas y esto se refleja en una disminución del tamaño de los lipoplejos.

Tabla 6.3. Carga de los tensioactivos para cada composición α calculada a partir de medidas de potencial Zeta (pZ) y tamaño.

α	carga a partir de datos de pZ		carga a partir de datos de tamaño	
	RuC11C11	RuC19C19	RuC11C11	RuC19C19
0.2	1.88	1.89	1.94	1.79
0.4	1.77	1.95	1.95	1.94
0.5	1.83	1.91	1.88	1.78
0.6	1.99	1.79	1.72	1.84
0.7	1.90	1.84	1.79	1.90
0.8	1.92	1.99	1.86	1.82

El mismo comportamiento se observa independientemente del metalosurfactante empleado para la formación de los liposomas y de la composición de estos (α). El valor de L/D al cual ocurre un aumento del tamaño del complejo liposoma/ADN sí depende del valor de α . En la Tabla 6.2 se muestran los valores de L/D correspondientes al máximo observado de los tamaños. Se puede ver que los valores son parecidos a los obtenidos a partir de las medidas de potencial Zeta. Esto se muestra también en la Figura 6.7.

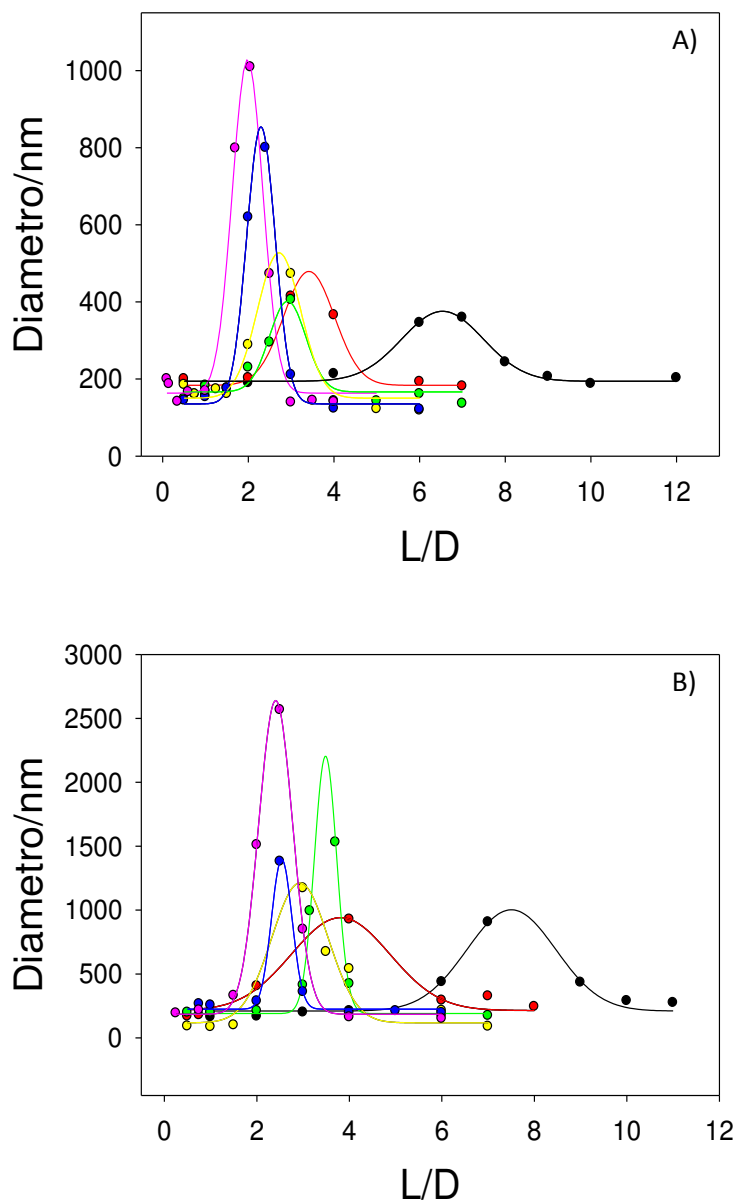


Figura 6.6. Representación del tamaño en orden creciente de L/D, donde: (●) $\alpha = 0.2$, (●) $\alpha = 0.4$, (●) $\alpha = 0.5$, (●) $\alpha = 0.6$, (●) $\alpha = 0.7$ y (●) $\alpha = 0.8$ para A) RuC11C11 y B) RuC19C19

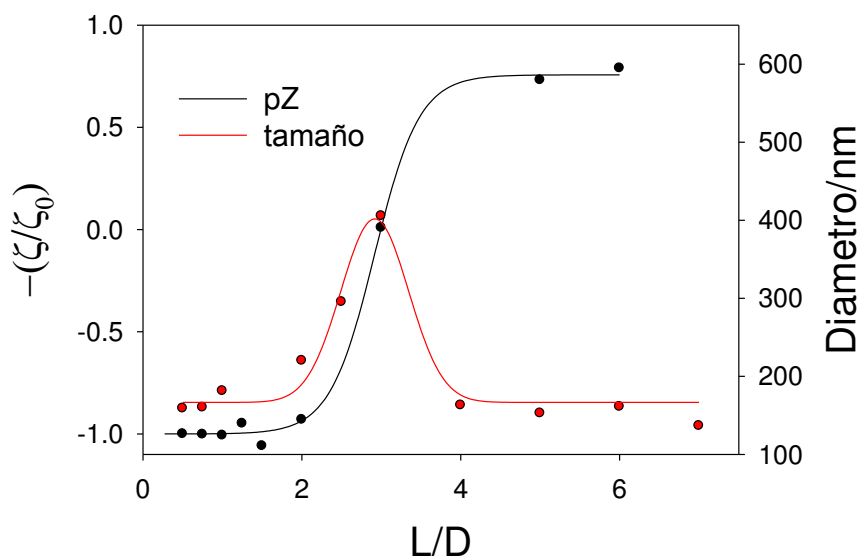


Figura 6.7. Comparación de los resultados obtenidos por potencial Zeta y tamaño de partículas.

Además de la carga y del tamaño del lipoplejo, un factor muy importante es la morfología de los nanovectores, ya que es la forma esférica la que mejor se adapta a su uso como vector de terapia génica. Se realizó un estudio morfológico usando la microscopía de transmisión electrónica (ver Figura 6.8). Para el uso de esta técnica se requieren elementos con alta densidad electrónica, para este sistema no requerimos la contratinción ya que la densidad electrónica la proporcionan los átomos de rutenio de la cabeza de los tensioactivos.

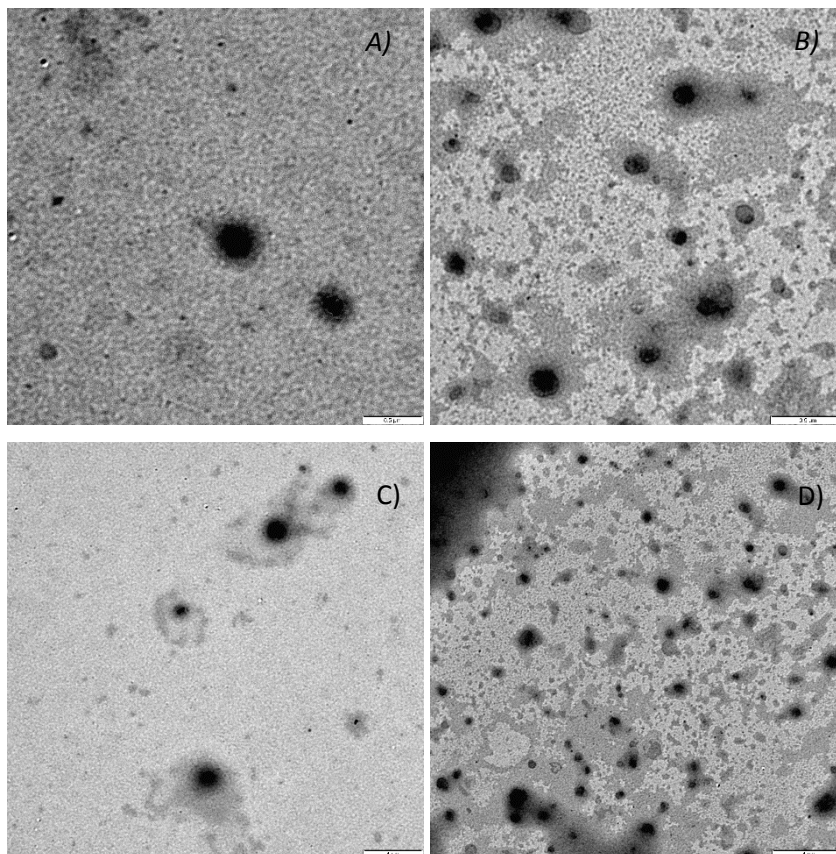


Figura 6.8. Imágenes de los liposomas A) y C), con un tamaño medio de 240 ± 80 y 220 ± 60 nm respectivamente, y el lipoplejo B) y D), con un tamaño medio de 160 ± 30 y 180 ± 50 nm. Donde A) y B) son para agregados con RuC11C11 y C) y D) para RuC19C19.

En la Figura 6.8. se observa claramente que los liposomas tienen forma esférica. Además, para un valor de $L/D=7$ se observa que las moléculas de ADN parecen disponerse alrededor de los liposomas, formando los lipoplejos.

Como se ha comentado en la introducción uno de las principales barreras fisiológicas que existen al introducir una molécula de ADN en una célula, es el tamaño de estas. Por esta razón se ha procedido a realizar un estudio sobre los posibles cambios conformacionales que pueden afectar al ADN cuando se encuentra en presencia de nuestros liposomas.

Se comenzó estudiando la modificación el espectro característico de dicroísmo circular correspondiente al ADN (ver Figura 6.9) en su conformación B, cuando varía la composición de los liposomas. Este espectro muestra dos bandas de distinto signo: una banda negativa debido la helicidad de la doble hebra, y una banda positiva, debida al apilamiento de los pares de bases nitrogenadas³³.

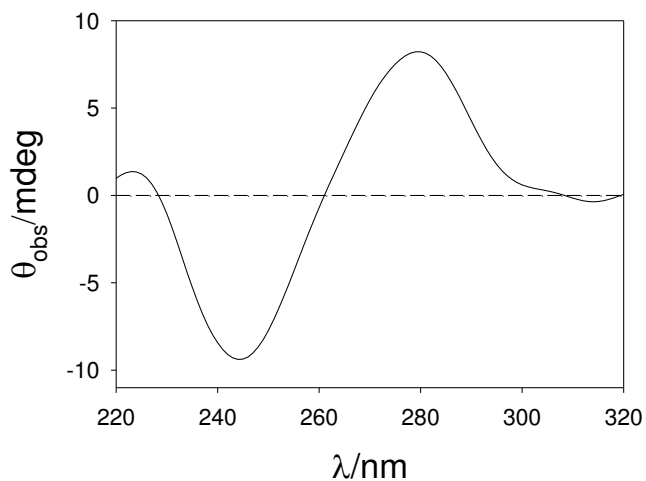


Figura 6.9. Espectro característico del B-ADN por dicroísmo circular.

En la

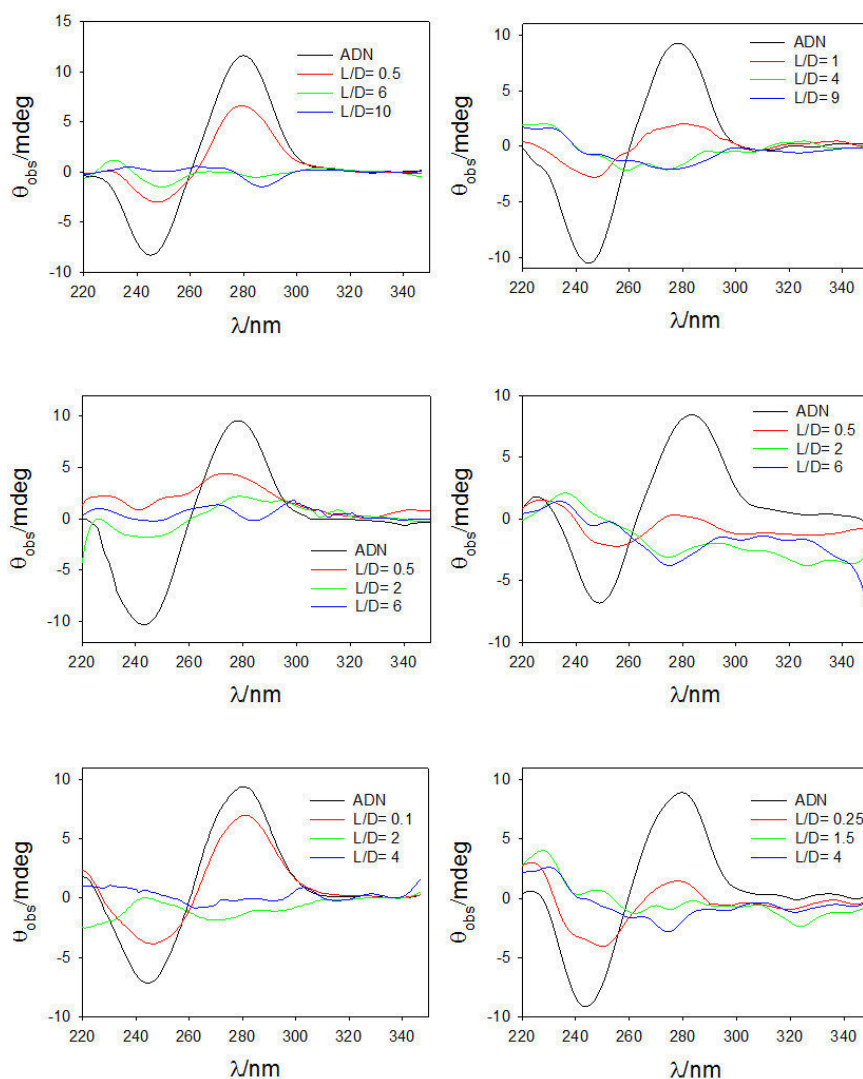


Figura 6.10 se muestra cómo al aumentar L/D desaparecen las bandas del ADN. Esto se debe a que se pierde la estructura secundaria del polinucleótido cuando se forma el lipoplejo. Esto se observa a valores de L/D muy bajos, incluso por debajo de los valores de L/D para los que se alcanza la electroneutralidad del sistema e indica la fuerte interacción existente entre el liposoma y el polinucleótido. Este comportamiento es similar para todos los valores de α estudiados, y para los dos metalosurfactantes. Conforme aumenta α , el espectro del ADN desaparece a valores de L/D menores. Esto concuerda

con los resultados obtenidos a partir de las medidas de potencial zeta, donde la inversión de carga tiene lugar a valores de L/D más bajos conforme aumenta α .

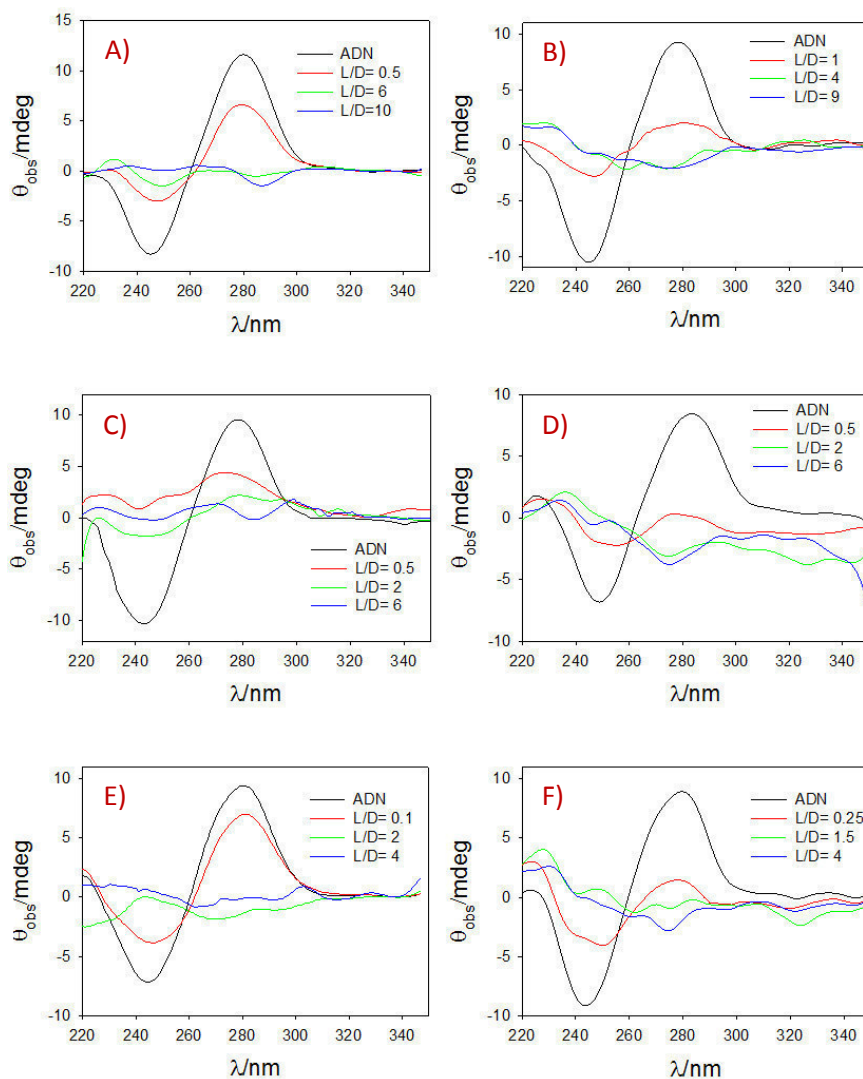


Figura 6.10. Variación de espectro de dicroísmo circular del ADN a diferentes valores de L/D . para RuC11C11: A) $\alpha=0.2$; C) $\alpha=0.5$; E) $\alpha=0.8$ y para RuC19C19: B) $\alpha=0.2$; D) $\alpha=0.5$ y F) $\alpha=0.8$.

Hay que hacer notar que en dicroísmo, el comportamiento observado se debe a un cambio conformacional del ADN cuando interacciona con los

liposomas de la disolución. Se produce entonces un cambio en el espectro de ADN, el cual llega a desaparecer a valores de L/D muy bajos. Sin embargo, en las medidas de potencial Zeta, el comportamiento observado se debe a una inversión de la carga de los lipoplejos al aumentar la concentración de lípido catiónico. El cambio estructural del polinucleotido se produce antes de que se neutralicen todas las cargas, ya que son necesarias pocas moléculas de liposoma para distorsionar la conformación del ADN.

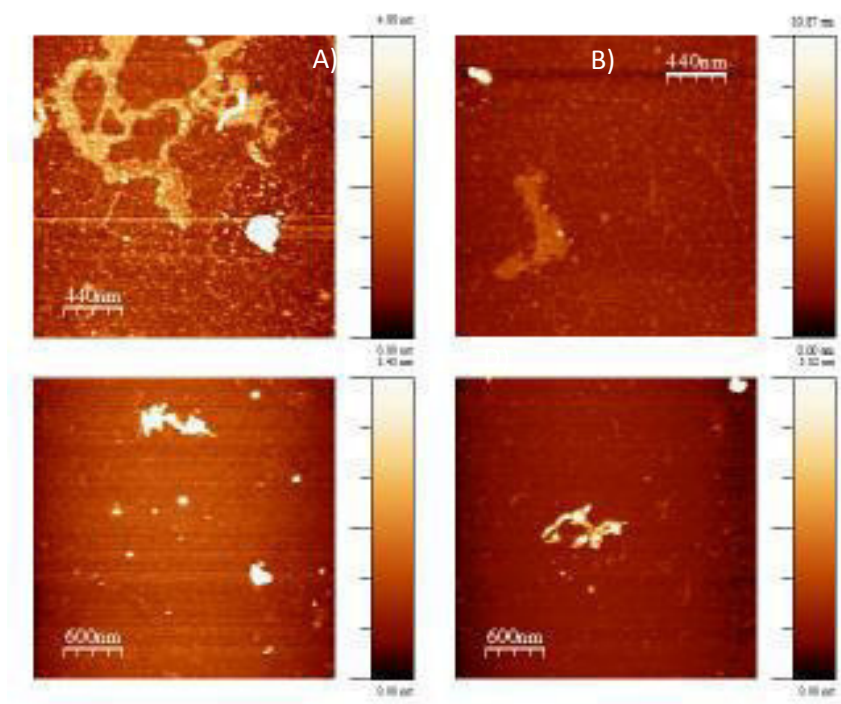


Figura 6.11. Imágenes topográficas de AFM de los lipoplejos de $\alpha = 0.2$ para los dos metalosurfactantes: RuC11C11: A) L/D= 2 y C) L/D= 11 y RuC19C19 B) L/D= 2 y D) L/D= 11.

Para confirmar que el ADN se encuentra compactado se obtuvieron imágenes topográficas mediante medidas de AFM (ver Figura 6.11). Estos estudios muestran hebras de ADN libres para L/D=2, para un valor de $\alpha=0.2$. Para este valor de α , el ADN cambia su estructura a partir de L/D=2. Por el contrario, a un valor de L/D =11 todas las hebras se encuentran compactadas

por el liposoma, con el polinucleótido distribuido alrededor de éstos, envolviéndolos, como ya se intuía a partir de las imágenes de TEM.

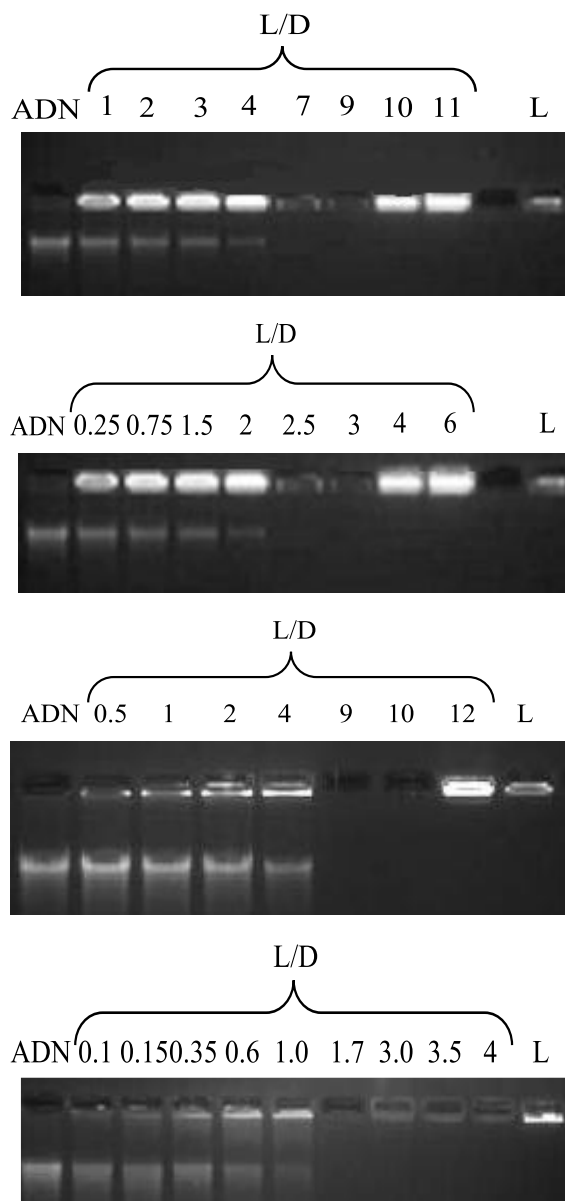


Figura 6.12. Fotografías de las electroforesis realizadas para los lipoplejos con tensioactivo catiónico: RuC11C11; A) $\alpha = 0.2$, B) $\alpha = 0.8$ y RuC19C19; C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.8$.

Con el fin de profundizar más en el estudio de estos sistemas se realizaron medidas de movilidad electroforética en gel de agarosa. Esta técnica permite separar moléculas en función de su relación carga/tamaño, ya que mide la migración de las partículas a través de un gel de agarosa (este se comporta como un tamiz molecular) cuando se someten a una diferencia de potencial. Los resultados se muestran en la Figura 6.12.

Como se puede apreciar en la Figura 6.12, con ADN puro se observa un desplazamiento hacia el polo positivo de la placa de electroforesis. El desplazamiento disminuye progresivamente conforme aumenta la relación L/D. Este comportamiento se debe a la disminución de carga del lipoplejo y/o a un aumento en el tamaño de este complejo. A partir de un valor de L/D no se observa desplazamiento de las bandas, lo que indica una inversión de carga.

6.3 Conclusiones.

A partir de los datos obtenidos se han formulado las siguientes conclusiones:

1. El tamaño de los liposomas es el resultado entre un balance de interacciones electrostáticas repulsivas y de interacciones hidrofobias de naturaleza atractiva. Dependiendo de la constitución del liposoma una primará sobre otra variando así su tamaño con la composición de los liposomas (α).
2. Se ha confirmado la formación del lipoplejo. Además, se ha determinado la constante de equilibrio aparente de unión entre el liposoma y el ADN. Sobre estas constantes de interacción, se observa que al incrementar la proporción de tensioactivo catiónico del liposoma esta constante aumenta.
3. Se produce una inversión de carga al aumentar la relación L/D para los dos tensioactivos a distintas composiciones. También se observa un máximo en el tamaño de los lipoplejos. La inversión de carga y el valor más alto para el tamaño se observan a valores de L/D semejantes.
4. La estructura de los liposomas y de los lipoplejos es esférica. En cuanto a la estructura del polinucleotido, podemos afirmar que este se compacta a todos los valores de α y para los dos metalosurfactantes. Además, esta compactación se produce a valores bajos de L/D, los que nos confirma la gran afinidad que tiene el ADN por los liposomas catiónicos investigados.

6.4 Bibliografía.

- (1) Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Liposomes and Nanoparticles: Nanosized Vehicles for Drug Delivery in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30* (11), 592–599.
- (2) Hanna, E.; Rémuzat, C.; Auquier, P.; Toumi, M. Gene Therapies Development: Slow Progress and Promising Prospect. *J. Mark. Access Heal. Policy* **2017**, *5* (1), 1265293.
- (3) Flotte, T. R. Gene Therapy: The First Two Decades and the Current State-of-the-Art. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213* (2), 301–305.
- (4) Berry, G.; Billingham, M.; Alderman, E.; Richardson, P.; Torti, F.; Lum, B.; Patek, a; Martin, F. J. Original Article The Use of Cardiac Biopsy to Demonstrate Reduced Cardiotoxicity in AIDS Kaposi ' s Sarcoma Patients Treated with Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Ann. Oncol.* **1998**, No. July, 711–716.
- (5) Safra, T.; Jeffers, F. M. S.; Groshen, S.; Lyass, O.; Henderson, R.; Berry, G.; Gabizon, a. Original Article Patients Reaching or Exceeding Cumulative Doses of 500 Mg / m². *Ann. Intern. Med.* **2000**, *11* (January), 1029–1033.
- (6) Batist, B. G.; Ramakrishnan, G.; Rao, C. S.; Chandrasekharan, A.; Gutheil, J.; Guthrie, T.; Shah, P.; Khojasteh, A.; Nair, M. K.; Hoelzer, K.; et al. Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19* (5), 1444–1454.
- (7) Ansari, L.; Shieh-zadeh, F.; Taherzadeh, Z.; Nikoofal-Sahlabadi, S.; Momtazi-Borojeni, A. A.; Sahebkar, A.; Eslami, S. The Most Prevalent Side Effects of Pegylated Liposomal Doxorubicin Monotherapy in

- (7) Ansari, L.; Shiehzhadeh, F.; Taherzadeh, Z.; Nikoofal-Sahlabadi, S.; Momtazi-Borojeni, A. A.; Sahebkar, A.; Eslami, S. The Most Prevalent Side Effects of Pegylated Liposomal Doxorubicin Monotherapy in Women with Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review of Clinical Trials. *Cancer Gene Ther.* **2017**, *24* (5), 189–193.
- (8) Comités de La EMA: Comité de Terapias Avanzadas (CAT) - EUPATI. **2015**, 1–4.
- (9) Shim, G.; Kim, D.; Le, Q.-V.; Park, G. T.; Kwon, T.; Oh, Y.-K. Nonviral Delivery Systems For Cancer Gene Therapy: Strategies And Challenges. *Curr. Gene Ther.* **2018**, *18*, 3–20.
- (10) Hidai, C.; Kitano, H. Nonviral Gene Therapy for Cancer: A Review. *Diseases* **2018**, *6* (3), 57.
- (11) Huang, Z.; Tomitaka, A.; Raymond, A.; Nair, M. Current Application of CRISPR/Cas9 Gene-Editing Technique to Eradication of HIV/AIDS. *Gene Ther.* **2017**, *24* (7), 377–384.
- (12) Guo, X.; Huang, L. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 971–979.
- (13) Wei, Y.; Sticca, R. P.; Holmes, L. M.; Burgin, K. E.; Li, J.; Williamson, J.; Evans, L.; Smith, S. J.; Stephenson, J. J.; Wagner, T. E. Dendritoma Vaccination Combined with Low Dose Interleukin-2 in Metastatic Melanoma Patients Induced Immunological and Clinical Responses. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28* (3), 585–593.
- (14) MacLaren, R. E.; Groppe, M.; Barnard, A. R.; Cottriall, C. L.; Tolmachova, T.; Seymour, L.; Reed Clark, K.; During, M. J.; Cremers, F. P. M.; Black, G. C. M.; et al. Retinal Gene Therapy in Patients with Choroideremia: Initial Findings from a Phase 1/2 Clinical Trial. *Lancet*

- 2014**, 383 (9923), 1129–1137.
- (15) Hacein-Bey Abina, S.; Gaspar, H. B.; Blondeau, J.; Caccavelli, L.; Charrier, S.; Buckland, K.; Picard, C.; Six, E.; Himoudi, N.; Gilmour, K.; et al. Outcomes Following Gene Therapy in Patients with Severe Wiskott-Aldrich Syndrome. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2015**, 313 (15), 1550–1563.
 - (16) Ginn, S. L.; Amaya, A. K.; Alexander, I. E.; Edelstein, M.; Abedi, M. R. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An Update. *J. Gene Med.* **2018**, 20 (5), 3015.
 - (17) Novelli, G. Genome Medicine: Gene Therapy for the Millennium. *Pharmacogenomics* **2002**, 3 (1), 15–18.
 - (18) Xu, L.; Anchordoquy, T. Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine: Challenges and Opportunities in the Delivery of Nucleic Acid-Based Therapeutics. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100 (1), 38–52.
 - (19) Mohanty, R. K.; Thennarasu, S.; Mandal, A. B. Resveratrol Stabilized Gold Nanoparticles Enable Surface Loading of Doxorubicin and Anticancer Activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 114, 138–143.
 - (20) Jiménez Blanco, J. L.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. Molecular Nanoparticle-Based Gene Delivery Systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, 42, 18–37.
 - (21) Sharma, A. K.; Gupta, L.; Gupta, U. *Nanoparticles as Nucleic Acid Delivery Vectors*; Elsevier Ltd, 2017.
 - (22) Gennaro, A. R. *Remington Farmacia*, 20^o.; medica panamericana, 2003.

- (23) Ostos, F. J.; Lebrón, J. A.; Moyá, M. L.; López-López, M.; Sánchez, A.; Clavero, A.; García-Calderón, C. B.; Rosado, I. V.; López-Cornejo, P. P-Sulfocalix[6]Arene as Nanocarrier for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Chem. - An Asian J.* **2017**, *12*, 679–689.
- (24) Zafar, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Cyclodextrin Containing Biodegradable Particles: From Preparation to Drug Delivery Applications. *Int. J. Pharm.* **2014**, *461* (1–2), 351–366.
- (25) Antoniuk, I.; Amiel, C. Cyclodextrin-Mediated Hierarchical Self-Assembly and Its Potential in Drug Delivery Applications. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (9), 2570–2588.
- (26) Gallego-Yerga, L.; Benito, J. M.; Blanco-Fernández, L.; Martínez-Negro, M.; Vélaz, I.; Aicart, E.; Junquera, E.; Ortiz Mellet, C.; Tros de Ilarduya, C.; García Fernández, J. M. Plasmid-Templated Control of DNA–Cyclodextrin Nanoparticle Morphology through Molecular Vector Design for Effective Gene Delivery. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (15), 3825–3835.
- (27) Valero, L.; Alhareth, K.; Romero, J. E.; Viricel, W.; Leblond, J.; Chissey, A.; Dhotel, H.; Roques, C.; Arruda, D. C.; Escriou, V.; et al. Liposomes as Gene Delivery Vectors for Human Placental Cells. *Molecules* **2018**, *23* (5), 1–9.
- (28) Sun, D.; Zhao, L.; Lin, J.; Zhao, Y.; Zheng, Y. Cationic Liposome Co-Encapsulation of SMAC Mimetic and ZVAD Using a Novel Lipid Bilayer Fusion Loaded with MLKL-PDNA for Tumour Inhibition in Vivo. *J. Drug Target.* **2018**, *26* (1), 45–54.
- (29) Kang, X.; Zheng, Z.; Liu, Z.; Wang, H.; Zhao, Y.; Zhang, W.; Shi, M.; He, Y.; Cao, Y.; Xu, Q.; et al. Liposomal Codelivery of Doxorubicin and

- Andrographolide Inhibits Breast Cancer Growth and Metastasis. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (4), 1618–1626.
- (30) Gregoriaadis, G. THE CARRIER POTENTIAL OF LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 704–710.
- (31) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (21), 7413–7417.
- (32) Menger, F. M.; Portnoy, C. E. On the Chemistry of Reactions Proceeding Inside Molecular Aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (18), 4698–4703.
- (33) Grueso, E.; Cerrillos, C.; Hidalgo, J.; Lopez-Cornejo, P. Compaction and Decomposition of DNA Induced by the Cationic Surfactant CTAB. *Langmuir* **2012**, *28* (30), 10968–10979.

Capítulo 7º.

Aplicaciones de
metalosurfactante y sus
agregados

En la última década se han producido grandes progresos en el uso de nanotransportadores, NTs, para fármacos¹⁻⁵. El uso de estos nanovehículos tiene numerosas aplicaciones en medicina, especialmente centradas en la terapia génica y en tratamientos contra el cáncer. Entre los NTs que se han empezado a investigar más recientemente se encuentran los liposomas y las micelas micelas⁶, estructuras que se han descrito con anterioridad.

Yanhui Zhang y colaboradores describen el empleo de micelas poliméricas de mPEG-PLA para la encapsulación y el transporte de la ciclosporina A, un inhibidor de la calcineurina, mejorando la solubilidad y la absorción por vía oral de este fármaco⁷. Recientemente Kandekar y colaboradores estudiaron el empleo de micelas poliméricas para su empleo como nanotransportador del adapaleno. Las micelas están constituidas por un copolímero dibloque de D- α -tocoferol polietilenglicol succinato. El adapaleno es un medicamento retinoide de tercera generación y su uso más común es para tratar enfermedades cutáneas como el acné. Los resultados muestran que el empleo de micelas para el transporte de este fármaco mejora su actividad terapéutica y disminuye los efectos secundarios⁸.

Bhushan S. Pattni y colaboradores⁹ muestran una lista de los nombres comerciales de medicamentos encapsulados en liposomas. Además, también realizan una recopilación de otros sistemas que se encuentra en fase de ensayo clínico. Estos autores describen los métodos de síntesis de los liposomas y como se caracterizan. Upendra Bulbake y colaboradores¹⁰ realizan una revisión sobre la encapsulación de fármacos en liposomas, donde se muestran los distintos métodos de encapsulación (DepoFoam™, Stealth Liposome, etc.). También mencionan los productos farmacológicos en el mercado basados en la encapsulación en liposomas.

Los medicamentos empleados contra el cáncer también se han encapsulado en diferentes tipos de micelas con el objetivo de mejorar la

eficacia antitumoral y de reducir los efectos secundarios. En este sentido, se prepararon micelas basadas en conjugados anfifílicos de 3 hélices-PEG para transportar y liberar la doxorubicina. Los resultados muestran una alta vida media y una baja acumulación en diferentes órganos y tejidos¹¹⁻¹³. Otros medicamentos encapsulados son: Paclitaxel¹⁴, camptotecina¹⁵, complejos de platino¹⁶ y tamoxifeno¹⁷.

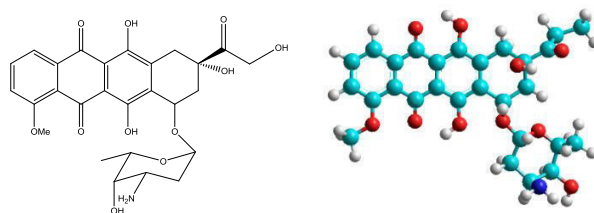
Las micelas y los liposomas se pueden formar a partir de tensioactivos derivados de complejos metálicos, es decir, moléculas de tensioactivos que contienen un complejo de coordinación en el grupo de cabeza. Este complejo metálico se encuentra unido a la estructura del tensioactivo, y por lo tanto, a las estructuras que estos formen. En la bibliografía se han encontrado agregados micelares de metalosurfactantes formados por: hierro^{18,19}, cobalto²⁰, cromo²¹, paladio²², molibdeno²³ y rutenio^{24,25} entre otros. Estos complejos metálicos pueden usarse como fármacos para diversas aplicaciones terapéuticas, especialmente para tratamientos contra el cáncer. Se prepararon nuevos metalosurfactantes que contenían cobalto (III), de cadena simple y doble. Esto último permitiría estudiar el papel que desempeña el carácter hidrofóbico de los metalosurfactantes en el proceso de penetración en la membrana celular²⁶. Los resultados mostraron una citotoxicidad más alta de los tensioactivos de doble cadena. Según los autores, esto se debe a una mayor hidrofobicidad en la estructura que favorece su penetración en la célula y la posterior muerte celular. En general, la presencia de iones metálicos como parte integral del conjunto micelar parece favorecer la internalización de tales estructuras en las células²⁷.

Diferentes agregados metalomicelares se han utilizado para procesos tales como la catálisis, el transporte y la detección química²⁸. Recientemente, se han tomado diferentes metalosurfactantes como matriz, o complejo precursor, en la preparación de nanopartículas^{29,30}. En general, los

metalosurfactantes se consideran moléculas que presentan un gran potencial en un amplio espectro de aplicaciones^{19,31}.

Los estudios actuales han demostrado el beneficio de usar combinaciones de dos o más agentes terapéuticos en varias enfermedades^{32,33} tales como el cáncer, el VIH, enfermedades cardiovasculares etc. Teniendo en cuenta las características estructurales de las micelas y de los liposomas para encapsular diversas moléculas, las metalomicelas y los metaloliposomas podrían usarse con este propósito. El objetivo de este capítulo fue preparar micelas y liposomas, formados por tensioactivos derivados de $[\text{Rupy}]_3^{2+}$, que podrían actuar como agentes anticancerígenos por sí mismos. De hecho, pueden encontrarse en la bibliografía varios complejos de rutenio (II) que presentan buena actividad como agentes antineoplásicos, además de una disminución de los efectos secundarios en comparación con el cis-platino³⁴. Se estudiará su viabilidad celular en líneas celulares cancerígenas y sanas.

La doxorubicina (DOX) (nombre comercial adriamicina) es un fármaco ampliamente utilizado en la quimioterapia. Es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, con una estructura muy similar a la daunomicina. Se usa habitualmente en el tratamiento de gran variedad de tipos de cáncer³⁵ como son: el cáncer de mama, carcinoma bronquial y linfoma³⁶. Los antibióticos de la familia de las antraciclinas se caracterizan fundamentalmente por ser unos buenos agentes intercalantes entre los pares de bases del ADN³⁷. Se sabe que la intercalación de estos medicamentos inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos, ya que dificulta el buen funcionamiento de la enzima topoisomerasa II, que se encarga de desenrollar el ADN en los procesos de transcripción^{38,39}.



Esquema 7.1. Estructura de la doxorubicina.

La molécula de doxorubicina se encuentran constituida por dos partes muy diferenciadas, una parte está compuesta por cuatro anillos que contienen un grupo cromóforo como es la antraquinona, y por otro lado un grupo aminoazúcar⁴⁰. Es este grupo amino el responsable de la carga positiva que presenta este medicamento a pH fisiológico⁴¹. Como se ha comentado, la interacción de la doxorubicina con el ADN se debe a la intercalación de los anillos (parte plana de la molécula) entre los pares de bases. Christine A. Frederick y colaboradores⁴² describen este proceso de intercalación y proponen que, además, la región del azúcar se sitúa en el surco menor del ADN.

7.1 Preparación de disoluciones.

Todas las experiencias se han realizado en disolución tamponada con un buffer HEPES 10 mM a pH 7.4. Las medidas se han realizado a una temperatura de 298.0 ± 0.1 K.

7.1.1 Medidas de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia se han realizado manteniendo constante la concentración de DOX a un valor igual a $5.00 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ y se ha variado la concentración de metalosurfactante en un intervalo de 0 - $2.00 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³.

7.1.2 Encapsulación del fármaco.

La eficacia de encapsulación del fármaco se midió usando un método de diálisis. Este método se encuentra descrito en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis. La concentración de doxorubicina empleada en los estudios de encapsulación es de $1.85 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. La concentración de tensioactivo empleada es superior a la CMC por lo que serán las micelas formadas las que encapsulen la doxorubicina, la concentración es de $9.80 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

La concentración de liposomas empleado para la encapsulación del fármaco depende de la composición de este.

7.1.3 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

Los ensayos de citotoxicidad se han realizado siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de material y métodos de esta tesis. Las concentraciones que se han empleado varían dependiendo del sistema que se desea estudiar. Así tenemos:

Para los sistemas con monómeros se han empleado concentraciones inferiores a la correspondiente al valor de la CMC, concentraciones $< 4.00 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Para los sistemas con agregados de metalosurfactantes las concentraciones empleadas se encuentran por encima de la CMC, entre $2.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ y $7.00 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

En el caso de los liposomas la concentración máxima que se puede emplear viene limitada por la composición de estos agregados.

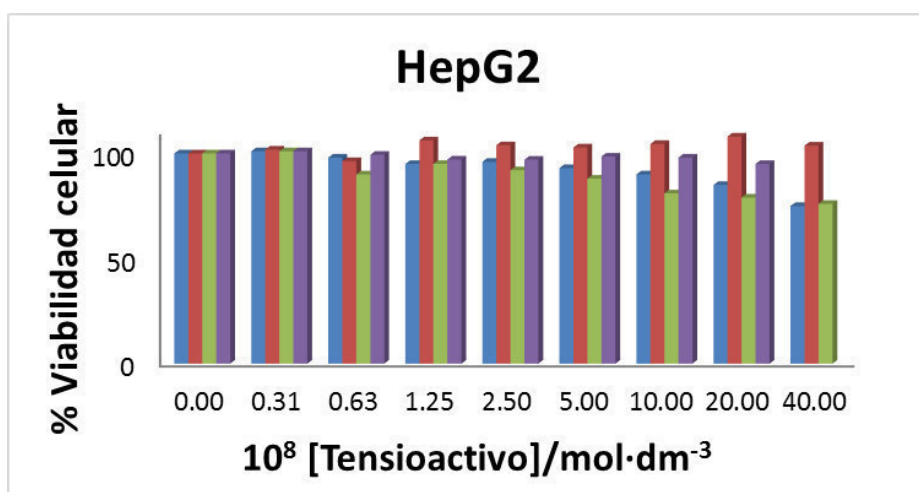
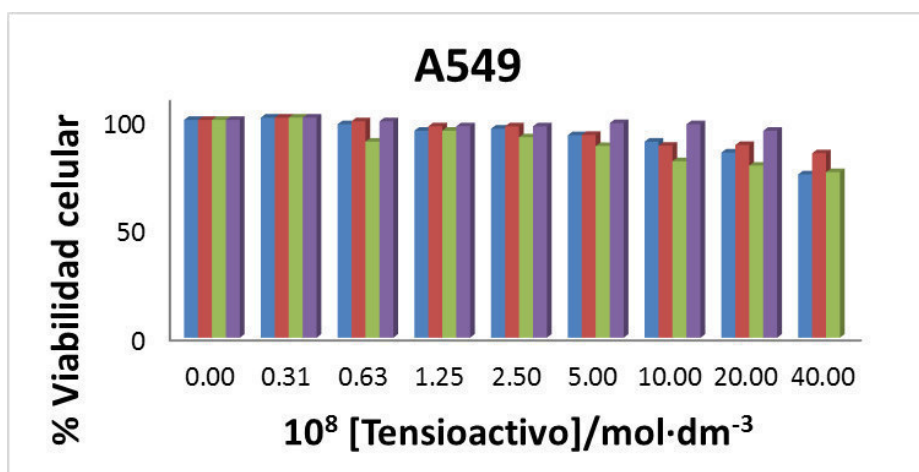
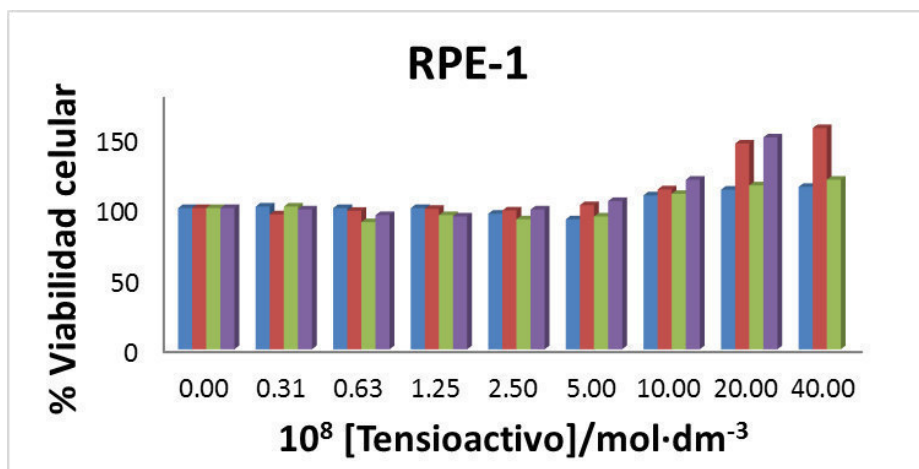
7.1.4 Microscopia de fluorescencia.

Para los estudios de internalización celular se ha usado una concentración superior a la concentración micelar crítica, $1.88 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Las líneas celulares se encuentran descritas en el capítulo de material y métodos de esta tesis.

7.2 Resultados y discusión

En esta tesis se ha estudiado previamente la interacción de los metalotensioactivos catiónicos y de los agregados de estos con el ADN. Estos estudios se realizaron con el objetivo de comprobar el posible uso de los complejos formados (metalosurfactante/ADN, micela/ADN y liposoma/ADN) como nanovectores de material genético. Con el fin de profundizar en la viabilidad del empleo de estos sistemas, en este capítulo se realizarán ensayos *in vitro*.

Se obtuvo información sobre la citotoxicidad de los vectores mediante las medidas de viabilidad celular de las distintas moléculas estudiadas. En la Figura 7.1 se recogen los datos de % de viabilidad celular a distintas concentraciones de metalotensioactivos. Todas las concentraciones son inferiores al valor de CMC.



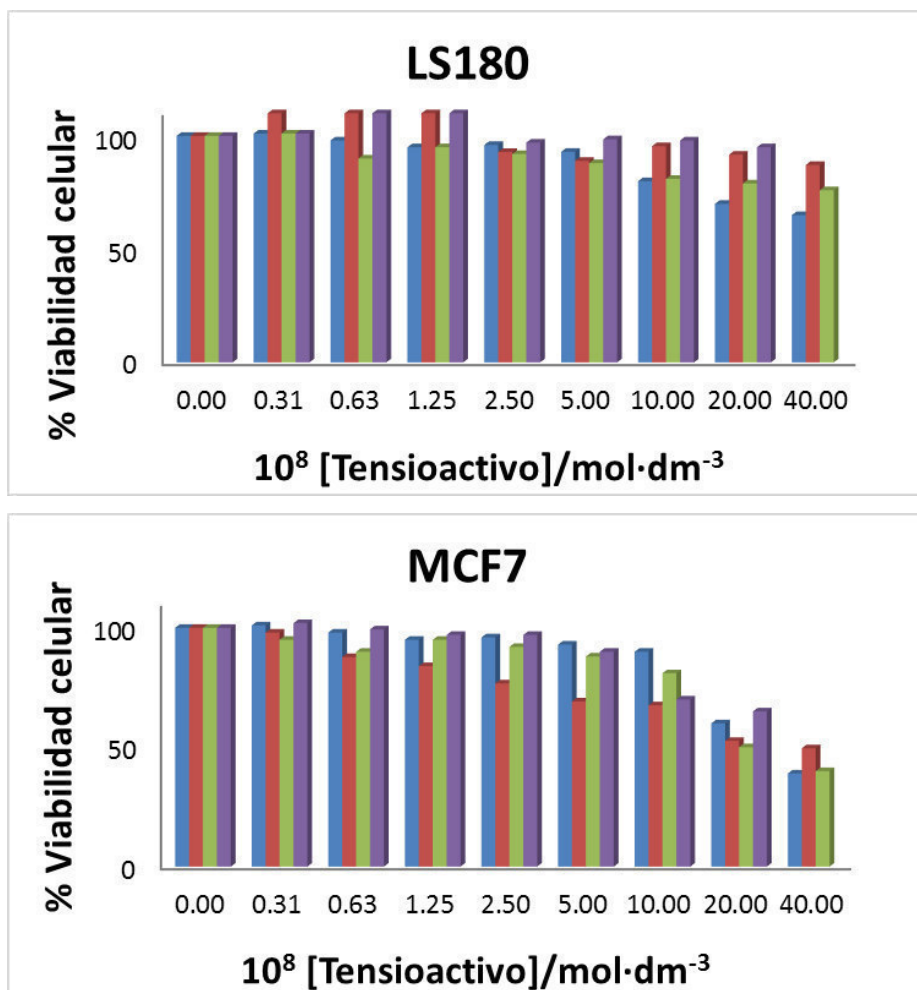


Figura 7.1. Resultados de viabilidad celular para la línea celular sana RPE-1, y para las líneas cancerígenas A549, HepG-2, LS180 y MCF-7, para los monómeros de los metalosurfactantes (●) RuC1C11, (●) RuC11C11, (●) RuC1C19 y (●) RuC19C19.

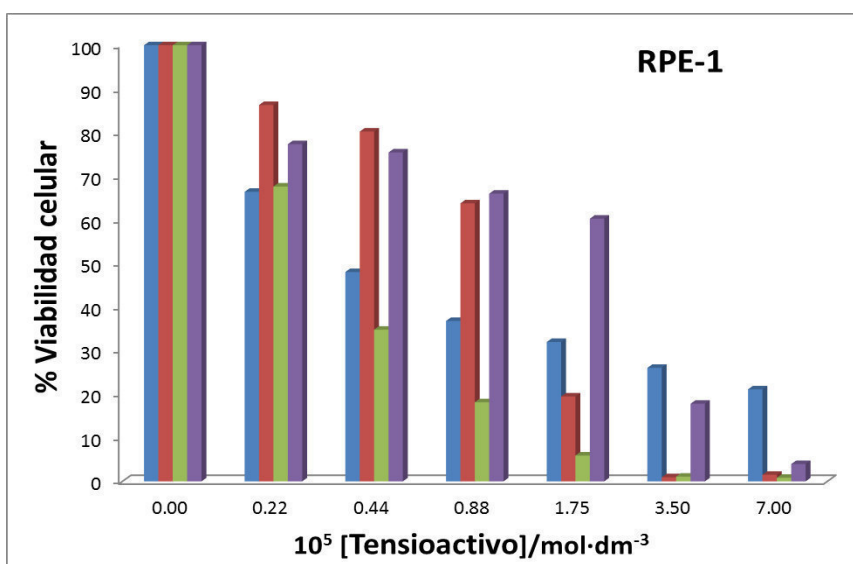
Como se puede observar a partir de los resultados obtenidos, los monómeros de metalosurfactantes prácticamente no afectan a la viabilidad de las células empleadas. En el caso de la línea celular sana (RPE-1) se aprecia que a valores altos de concentración de tensioactivo se obtienen unos valores de viabilidad celular superiores al 100%. Esto se puede deber a que la presencia de estas moléculas en el citoplasma conlleve un aumento de la actividad

metabólica. Este comportamiento se aprecia de una forma más pronunciada para los tensioactivos que poseen dos cadenas alifáticas.

Un análisis de los datos de viabilidad de las líneas celulares cancerígenas muestra que a valores altos de concentración de tensioactivo se produce una disminución en la población de células vivas en el sistema. Las células más afectadas son las que corresponden a la línea celular de cáncer de mama (MCF7). Cabe destacar que en todos los casos los tensioactivos que tienen una mayor viabilidad (menor citotoxicidad) son los metalosurfactantes de dos cadenas hidrocarbonadas. Estos resultados contrastan con los observados por otros autores²⁸.

Los resultados anteriores indican que los metalosurfactantes investigados podrían emplearse como vectores dada su baja citotoxicidad.

En esta tesis también se ha estudiado el empleo de micelas formadas por los metalosurfactantes como vectores de ADN (capítulo 5). Se mostró que los sistemas micelas/ADN presentan las características adecuadas para su empleo como nanovectores. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio sobre su viabilidad celular.



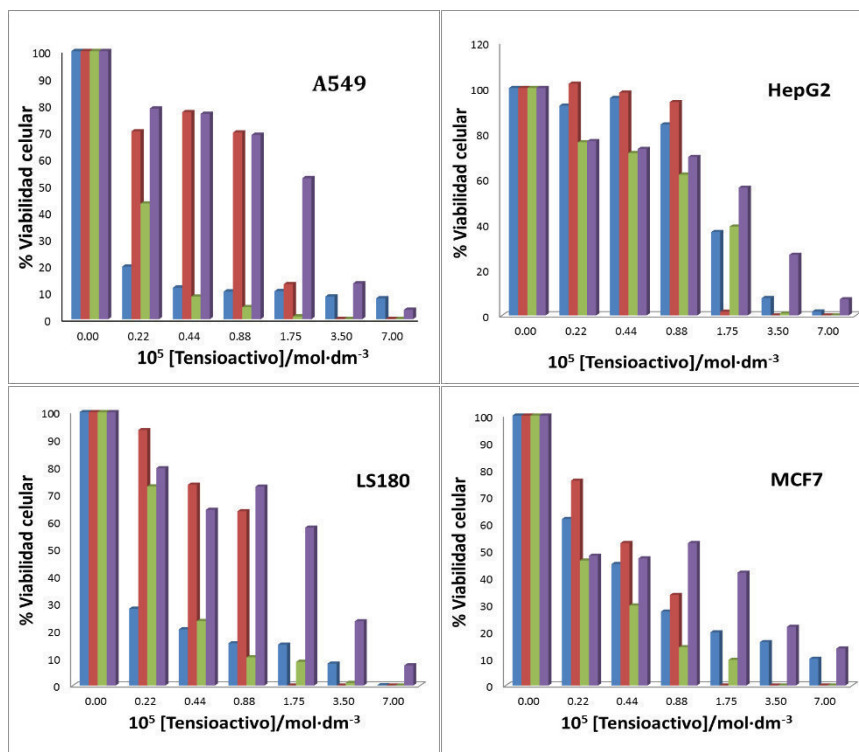


Figura 7.2. Resultados de viabilidad celular para la línea celular sana RPE-1, y para las líneas cancerígenas A549, HepG-2, LS180 y MCF-7. para los agregados micelares de los metalosurfactantes (●) RUC1C11, (●) RUC11C11, (●) RUC1C19 y (●) RUC19C19.

Los resultados de viabilidad celular para las distintas líneas celulares se muestran en la Figura 7.2. como se puede apreciar para valores altos de concentración los cuatro agregados de tensioactivos muestran el mismo comportamiento para todas las líneas celulares. A estas concentraciones la citotoxicidad es muy elevada. Sin embargo, para concentraciones intermedias dependiendo de la línea celular y de las moléculas empleadas se observa:

1. Para la línea de células sana (RPE-1), las moléculas menos citotóxicas son las que poseen dos cadenas alifáticas. Esta tendencia también se aprecia para la línea celular de cáncer de pulmón (A459) y de cáncer de colon (LS180).

2. Para la línea celular de cáncer de hígado (HepG2) se observa baja citotoxicidad para todos los agregados empleados.

3. Para la línea celular de cáncer de mama (MCF7) los valores de viabilidad celular están por debajo del 50% para todas las moléculas empleadas. Esto nos indica que para esta línea celular nuestros agregados son muy citotóxicos.

En base a los resultados de viabilidad celular mostrados se puede decir que los sistemas micelas/ADN no son buenos candidatos para su empleo en terapia génica debido a su elevada citotoxicidad.

La baja viabilidad celular mostrada por los agregado micelares hace de estos sistemas posibles candidatos para su uso como agentes antineoplásicos. Dado el interés del uso de una combinación de fármacos para el tratamiento de enfermedades, se pensó en la posibilidad de encapsular un medicamento antineoplásico, la doxorubicina, en el interior de nuestros agregados micelares.

El estudio de la encapsulación de la doxorubicina se inició estudiando la variación de la intensidad de emisión de fluorescencia del fármaco a distintas concentraciones de tensioactivo. Este estudio se ha realizado a concentraciones inferiores y superiores al valor de la CMC (ver Figura 7.3).

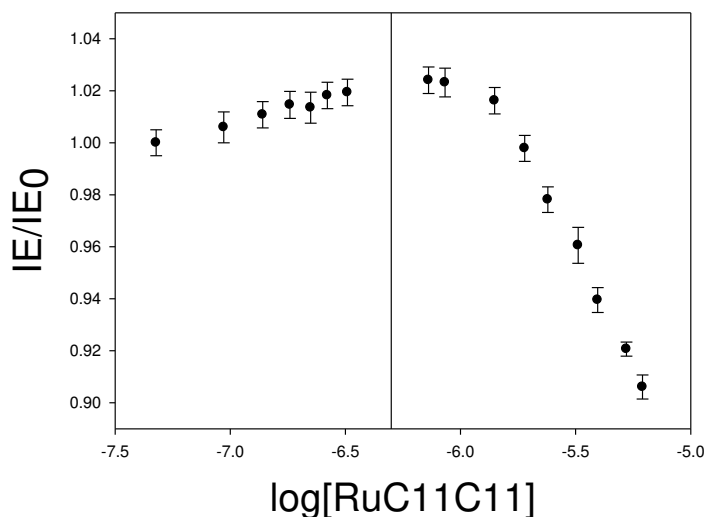


Figura 7.3. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia relativa de la doxorubicina con la concentración de metalosurfactante. La línea continua corresponde al valor de la CMC del tensioactivo.

Como se puede observar la intensidad de emisión de la doxorubicina aumenta un poco al aumentar la concentración de monómeros, hasta alcanzar un valor prácticamente constante. A partir de este valor, la intensidad de emisión decrece de forma abrupta, alcanzando valores inferiores al correspondiente a la doxorubicina pura. La zona constante corresponde a valores de concentraciones muy próximos al valor de la CMC de los tensioactivos. Este comportamiento se observa para los cuatro metalosurfactantes estudiados.

El comportamiento mostrado se debe principalmente a la encapsulación de la doxorubicina en las micelas. Ya que, cuando no hay micelas en la disolución la intensidad de emisión de la doxorubicina prácticamente no se modifica. Mientras que, en presencia de micelas, la intensidad de emisión decrece debido a interacciones entre éstas y la DOX.

Con el fin de comprobar si la DOX se encuentra encapsulada, además de cuantificar la cantidad de fármaco contenido en el interior de las micelas, se somete al sistema a un estudio de diálisis. Mediante esta técnica se puede conocer de una forma indirecta la cantidad de medicamento en el interior de las micelas. La diálisis permite la separación de moléculas que tengan un tamaño suficientemente distinto. Para realizar este estudio se sigue la liberación a través de la membrana de diálisis de la DOX libre con el tiempo (ver Figura 7.4)

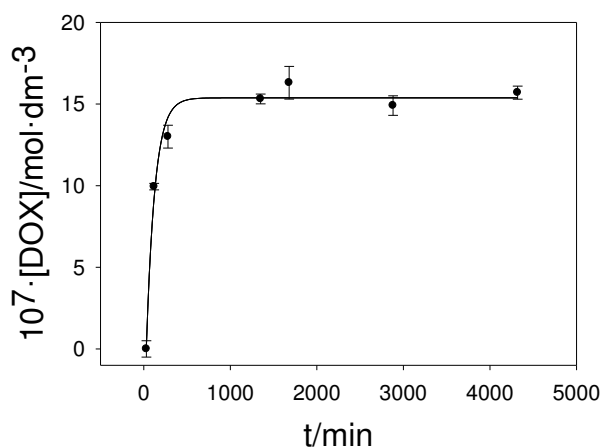


Figura 7.4. Evolución de la concentración de fármaco externo al saco de diálisis con el tiempo para las micelas formadas por el tensioactivo RuC11C11.

Como se observa en la Figura 7.4, la concentración de fármaco fuera del saco de diálisis aumenta con el tiempo hasta alcanzar un valor constante. Tendencias semejantes a esta se han obtenido para todas las metalomicelas estudiadas. El valor constante se corresponde con la concentración de DOX libre, $[DOX]_{\text{tampon}}$ en la ecuación 7.2; es decir, la concentración de fármaco no encapsulado. Conociendo los valores de concentraciones de fármaco libre y la inicial ($[DOX]_{\text{total}}$), se puede determinar el porcentaje de eficacia de encapsulación (%EE) para la DOX en nuestro sistema.

$$\%EE = \frac{[DOX]_{enc}}{[DOX]_{total}} \times 100 \quad 7.1$$

$$[DOX]_{enc} = [DOX]_{total} - [DOX]_{tampon} \quad 7.2$$

Los valores obtenidos de %EE para las distintas metalomicelas se muestran en la Tabla 7.1. se puede observar, que los valores obtenidos prácticamente son independientes de la naturaleza del tensioactivo que forma las micelas.

Tabla 7.1. Valores de porcentajes de eficacia de encapsulación para las distintas metalomicelas.

Tensioactivo	%EE
RuC1C11	55±5
RuC11C11	59±4
RuC1C19	57±4
RuC19C19	62±3

Los resultados muestran una alta capacidad de encapsulación, lo que permitiría utilizar las metalomicelas como nanotransportadores de la DOX.

Para que estos sistemas actúen de forma eficaz han de ser capaces de introducirse en las células, dado que muchos medicamentos contra el cáncer presentan su sitio de acción en el interior de estas. Para comprobar si las metalomicelas son capaces de atravesar las membranas celulares, se ha realizado un estudio de internalización celular usando la microscopía de fluorescencia.

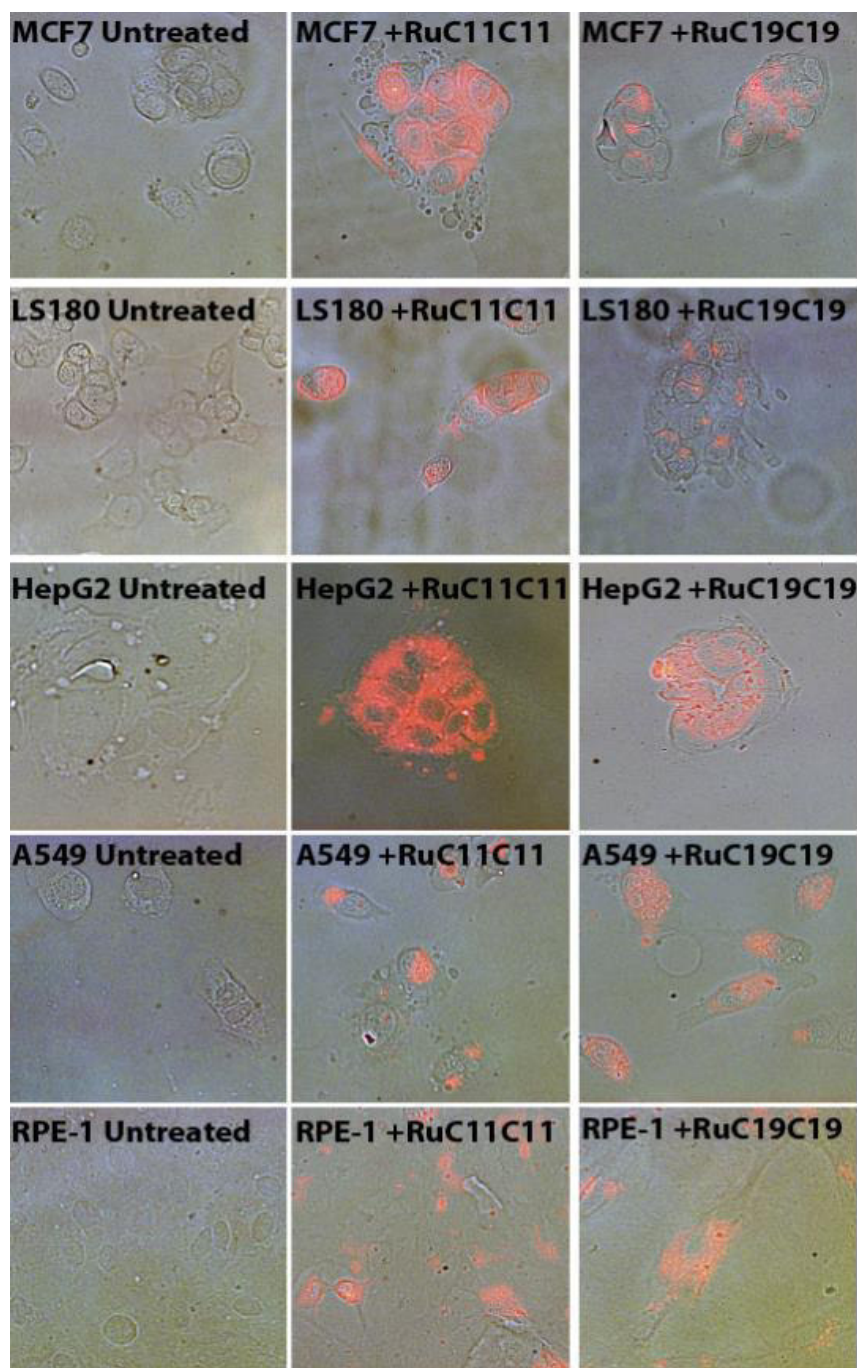


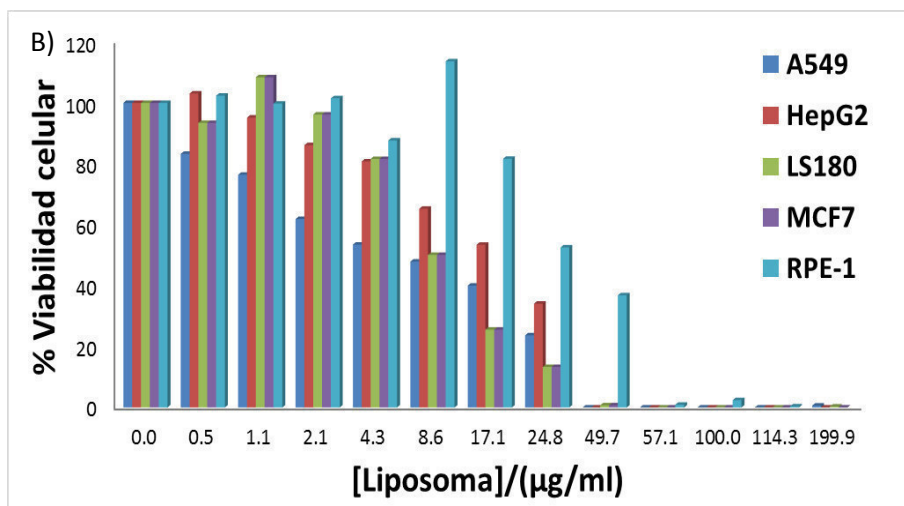
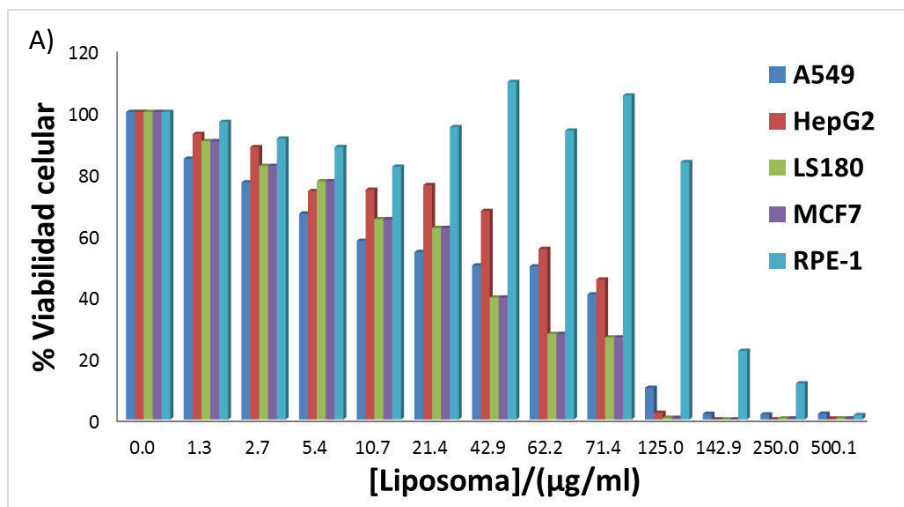
Figura 7.5. Microscopía de fluorescencia de las líneas celulares MCF7, LS180, HepG2, A549 y RPE-1 expuestas a micelas de RuC11C11 o micelas de RuC19C19 durante 24 horas, lavadas, fijadas y montadas en un portamuestra. La fluorescencia dentro de las células se determinó usando un filtro de excitación a 470-490 nm y un filtro de paso largo de emisión a 520 nm.

En estas experiencias se incubaron líneas celulares cancerosas y normales durante una noche con las micelas de RuC11C11 y de RuC19C19 (dada la similitud entre las micelas formadas con tensioactivos de una cadena y de dos sólo se realizaron con tensioactivos de doble cadena). Las micelas de rutenio (II) se detectaron dentro de las células en todas las líneas probadas, lo que indica que estos agregados se internalizan y, por tanto, se pueden emplear como nanotransportadores al ser capaces de transportar fármacos de manera eficiente dentro de las células (ver Figura 7.5.).

En esta tesis también se han empleado liposomas mixtos, formados por DOPE y metalosurfactantes. En el capítulo 6 se estudió la interacción de estos liposomas con ADN y se concluyó que los lipoplejos (complejo formado entre el ADN y los liposomas) tienen propiedades adecuadas para ser utilizados como nanovectores. Para comprobar la viabilidad celular de los liposomas se realizó un estudio de citotoxicidad con cuatro líneas celulares cancerosas y una línea sana, en presencia de distintas concentraciones de liposomas. Estas experiencias se han hecho para los dos metaloliposomas estudiados y para dos composiciones (α) distintas. Los resultados se recogen en la Figura 7.6.

Como se puede observar los liposomas formados por el metalosurfactante de cadena corta RuC11C11 (Figura 7.6. A) y B)) muestran una citotoxicidad elevada a altos valores de concentración para todas las líneas celulares. Por otro lado, se aprecian valores de concentraciones a los cuales la línea celular sana tiene una viabilidad celular alta, mientras que, para el resto de las líneas estudiadas ésta se encuentra por debajo del 50%. La diferencia en la concentración, donde se observa la diferencia de viabilidad celular entre la línea sana y las cancerosas, se debe principalmente a la composición de los liposomas (α). Los liposomas con un valor de α igual 0.2 tienen menos metalosurfactante por liposoma, por lo que su citotoxicidad es menor, para

una concentración igual de liposomas, que la presentada por los que tienen un valor de α igual a 0.8.



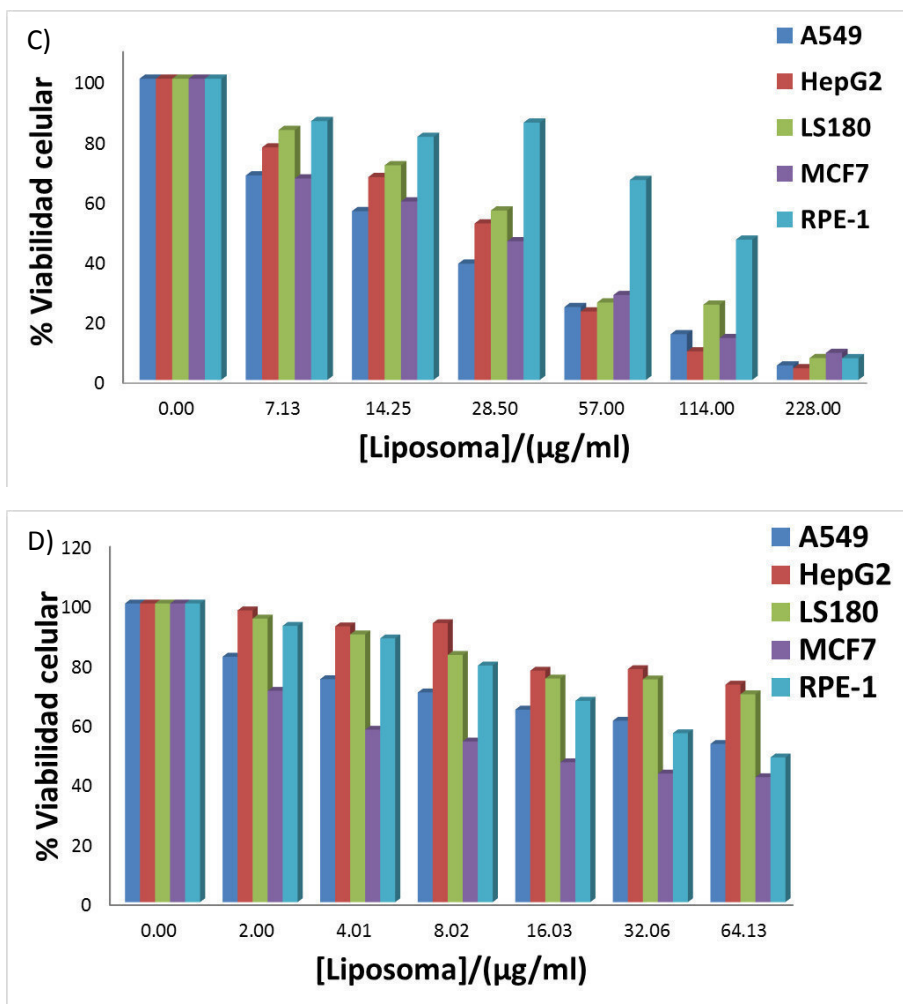


Figura 7.6. Viabilidad celular de los liposomas formados por RuC11C11 con: A) $\alpha=0.2$ y B) $\alpha=0.8$. Y los formados por RuC19C19 con: C) $\alpha=0.2$ y D) $\alpha=0.7$.

Los resultados para los metaloliposomas constituidos por el tensioactivo de cadena larga RuC19C19 (Figura 7.6. C) y D)) muestran un comportamiento distinto. En este caso los liposomas con una fracción molar de metalosurfactante igual a 0.2 muestran una alta citotoxicidad a concentraciones altas, mientras que los metaloliposomas con una composición de α igual a 0.7 solo muestran una citotoxicidad parcial. Esto permitiría el

empleo de estos metaloliposomas como vectores ya que muestran una viabilidad celular moderada.

A la vista de los resultados de viabilidad celular obtenidos para los metaloliposomas, se realizó el estudio de la encapsulación de la doxorubicina en ellos. Este estudio se lleva a cabo porque se aprecia una selectividad en la viabilidad celular entre las células sanas y cancerosas. Si a la actividad antineoplásica de los liposomas se sumara la de la doxorubicina encapsulada en su interior, aumentaría su eficacia.

En la Figura 7.7 se muestra la variación de la concentración libre de fármaco con el tiempo, obtenida por diálisis. Como se puede observar la concentración aumenta con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo. Este valor es la concentración de fármaco libre y conociendo esta y la concentración inicial se puede determinar el porcentaje efectivo de fármaco encapsulado. Para ello se emplean las ecuaciones 7.1 y 7.2.

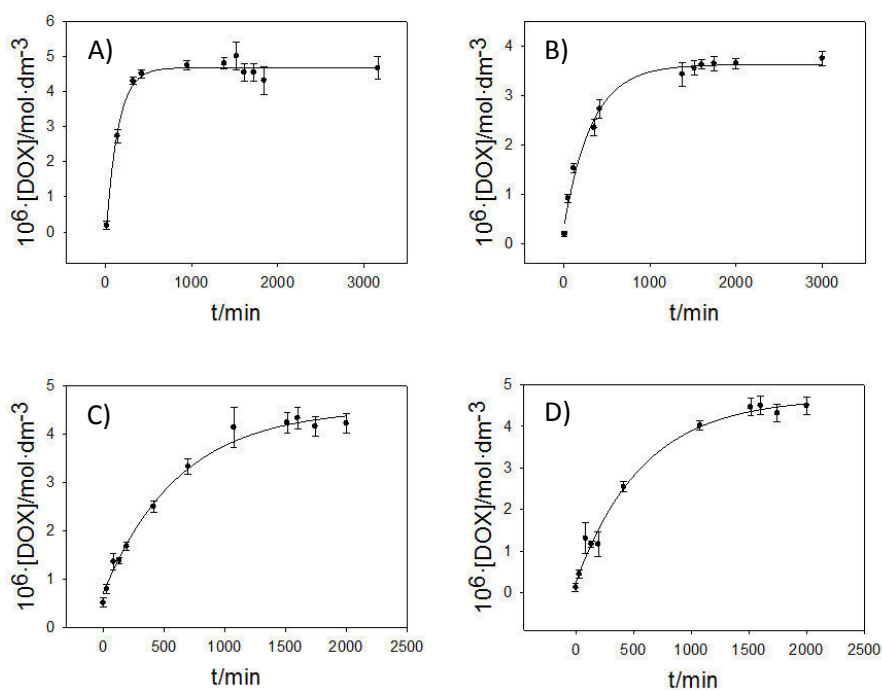


Figura 7.7. Evolución de la concentración de fármaco externo al saco de diálisis con el tiempo para liposomas formados por RuC11C11, a dos composiciones distintas A) $\alpha=0.2$ y B) $\alpha=0.8$. Y para los formados por RuC19C19, C) $\alpha=0.2$ y D) $\alpha=0.7$.

Tabla 7.2. Valores de los porcentajes de eficacia de encapsulación para los distintos metaloliposomas con distinta composición.

Tensioactivo	α	%EE
RuC11C11	0.2	74.8±1.2
	0.8	80±2
RuC19C19	0.2	76.7±0.5
	0.7	75.7±0.7

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.2. Como se puede apreciar, los valores de %EE son semejantes para los distintos liposomas investigados. Además, tampoco se observa una tendencia con la composición de estos. No obstante, la eficacia de encapsulación es elevada en todos los casos.

7.3 Conclusiones.

A partir de los resultados que se han obtenido en este capítulo podemos alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Los estudios de viabilidad celular de los monómeros de los cuatro metalosurfactantes indican una baja citotoxicidad de estos en las líneas celulares estudiadas. Sólo se aprecia una disminución de la viabilidad celular a concentraciones muy elevadas de tensioactivos y para las líneas cancerosas estudiadas.
2. Las metalomicelas estudiadas muestran una alta citotoxicidad para las líneas celulares investigadas. A partir de estudios *in vitro* se ha demostrado que las micelas de estos metalosurfactantes muestran una alta internalización celular. Además, estas metalomicelas son capaces de encapsular una cantidad apreciable de doxorubicina.
3. Los metaloliposomas estudiados muestran una alta capacidad de encapsulación para la doxorubicina. Con respecto a la viabilidad celular se aprecian diferencias dependiendo de la naturaleza del metalosurfactante.

Los liposomas formados por RuC11C11 muestran a concentraciones de liposomas intermedias una citotoxicidad selectiva para las células cancerosas. A concentraciones altas la viabilidad celular es prácticamente cero para todas las líneas estudiadas.

Los liposomas formados por RuC19C19 con una composición del 0.2, muestran una citotoxicidad selectiva para las líneas celulares cancerosas. Mientras que para la composición de 0.7, la viabilidad celular es independiente de la línea celular que se analice.

7.4 Bibliografía

- (1) Kim, C. K.; Ghosh, P.; Pagliuca, C.; Zhu, Z.; Menichetti, S. Kim et Al . - 2009 - Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells (2). Pdf Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells. **2009**, No. 2, 2–4.
- (2) Andrew MacKay, J.; Chen, M.; McDaniel, J. R.; Liu, W.; Simnick, A. J.; Chilkoti, A. Self-Assembling Chimeric Polypeptide-Doxorubicin Conjugate Nanoparticles That Abolish Tumours after a Single Injection. *Nat. Mater.* **2009**, 8 (12), 993–999.
- (3) Cheow, W. S.; Hadinoto, K. Enhancing Encapsulation Efficiency of Highly Water-Soluble Antibiotic in Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles: Modifications of Standard Nanoparticle Preparation Methods. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, 370 (1–3), 79–86.
- (4) Pastorino, L.; Erokhina, S.; Erokhin, V. Smart Nanoengineered Polymeric Capsules as Ideal Pharmaceutical Carriers. **2013**, 58–64.
- (5) Liu, D.; He, C.; Wang, A. Z.; Lin, W. Application of Liposomal Technologies for Delivery of Platinum Analogs in Oncology. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 8, 3309–3319.
- (6) Senapati, S.; Mahanta, A. K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, 3 (1), 7.
- (7) Zhang, Y.; Li, X.; Zhou, Y.; Wang, X.; Fan, Y.; Huang, Y.; Liu, Y. Preparation and Evaluation of Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Lactide) Micelles as Nanocarriers for Oral Delivery of Cyclosporine A. *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, 5 (6), 917–925.
- (8) Kandekar, S. G.; Del Río-Sancho, S.; Lapteva, M.; Kalia, Y. N. Selective Delivery of Adapalene to the Human Hair Follicle under Finite Dose Conditions Using Polymeric Micelle Nanocarriers. *Nanoscale* **2018**, 10 (3), 1099–1110.
- (9) Pattni, B. S.; Chupin, V. V.; Torchilin, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (19), 10938–10966.
- (10) Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **2017**, 9 (2), 1–33.

- (11) Dong, H.; Dube, N.; Shu, J. Y.; Seo, J. W.; Mahakian, L. M.; Ferrara, K. W.; Xu, T. Long-Circulating 15 Nm Micelles Based on Amphiphilic 3-Helix Peptide-Peg Conjugates. *ACS Nano* **2012**, 6 (6), 5320–5329.
- (12) Dube, N.; Shu, J. Y.; Dong, H.; Seo, J. W.; Ingham, E.; Kheirrolomoom, A.; Chen, P. Y.; Forsayeth, J.; Bankiewicz, K.; Ferrara, K. W.; et al. Evaluation of Doxorubicin-Loaded 3-Helix Micelles as Nanocarriers. *Biomacromolecules* **2013**, 14 (10), 3697–3705.
- (13) Ma, D.; DeBenedictis, E. P.; Lund, R.; Keten, S. Design of Polymer Conjugated 3-Helix Micelles as Nanocarriers with Tunable Shapes. *Nanoscale* **2016**, 8 (46), 19334–19342.
- (14) Zheng, N.; Lian, B.; Du, W.; Xu, G.; Ji, J. Extraction Protocol and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Determining Micelle-Entrapped Paclitaxel at the Cellular and Subcellular Levels: Application to a Cellular Uptake and Distribution Study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, 1072 (December 2017), 347–354.
- (15) Mu, L.; Chrastina, A.; Levchenko, T.; Torchilin, V. P. Micelles from Poly (Ethylene Glycol)–Phosphatidyl Ethanolamine Conjugates (Peg-Pe) as Pharmaceutical Nanocarriers for Poorly Soluble Drug Camptothecin. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2005**, 1 (2), 190–195.
- (16) Hang, Z.; Cooper, M. A.; Ziora, Z. M. Platinum-Based Anticancer Drugs Encapsulated Liposome and Polymeric Micelle Formulation in Clinical Trials. *Biochem. Compd.* **2016**, 4 (1), 1.
- (17) Gao, Z.; Lukyanov, A. N.; Singhal, A.; Torchilin, V. P. Diacyllipid-Polymer Micelles as Nanocarriers for Poorly Soluble Anticancer Drugs. *Nano Lett.* **2002**, 2 (9), 979–982.
- (18) Garcia, P.; Eaton, P.; Geurts, H. P. M.; Sousa, M.; Gameiro, P.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; Pereira, E.; De Castro, B. AFM and Electron Microscopy Study of the Unusual Aggregation Behavior of Metallosurfactants Based on Iron(II) Complexes with Bipyridine Ligands. *Langmuir* **2007**, 23 (15), 7951–7957.
- (19) Owen, T.; Butler, A. Metallosurfactants of Bioinorganic Interest: Coordination-Induced Self Assembly. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255 (7–8), 678–687.
- (20) Santhakumar, K.; Kumaraguru, N.; Arunachalam, S.; Arumugham, M. N. Thermodynamics and Micellar Properties of Some Surface Active Cobalt(III) Metallosurfactants in Nonaqueous Medium. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, 39 (1), 22–31.

- (21) Kumaraguru, N.; Santhakumar, K. Synthesis, Characterization, Critical Micelle Concentration Determination, and Antimicrobial Studies of Some Complexes of Chromium(III) Metallosurfactants. *J. Coord. Chem.* **2009**, 62 (21), 3500–3511.
- (22) Kaur, G.; Kumar, S.; Dilbaghi, N.; Kaur, B.; Kant, R.; Guru, S. K.; Bhushan, S.; Jaglan, S. Evaluation of Bis-hexadecyltrimethyl Ammonium Palladium Tetrachloride Based Dual Functional Colloidal Carrier as an Antimicrobial and Anticancer Agent. *Dalt. Trans.* **2016**, 45, 6582–6591.
- (23) Parera, E.; Comelles, F.; Barnadas, R.; Suades, J. Formation of Vesicles with an Organometallic Amphiphile Bilayer by Supramolecular Arrangement of Metal Carbonyl Metallosurfactants. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (15), 4460.
- (24) Domínguez-Gutiérrez, D.; Surtchev, M.; Eiser, E.; Elsevier, C. J. Ru(II)-Based Metallosurfactant Forming Inverted Aggregates. *Nano Lett.* **2006**, 6 (2), 145–147.
- (25) Bowers, J.; Amos, K. E.; Bruce, D. W.; Webster, J. R. P. Surface and Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of Ru(II) Metallosurfactants. 3. Effect of Chain Number and Orientation on the Structure of Adsorbed Films of [Ru(Bipy)₂(Bipy')]₂Cl₂ Complexes. *Langmuir* **2005**, 21 (4), 1346–1353.
- (26) Veeralakshmi, S.; Nehru, S.; Sabapathi, G.; Arunachalam, S.; Venuvanalingam, P.; Kumar, P.; Anusha, C.; Ravikumar, V. Single and Double Chain Surfactant–cobalt(III) Complexes: The Impact of Hydrophobicity on the Interaction with Calf Thymus DNA, and Their Biological Activities. *RSC Adv.* **2015**, 5 (40), 31746–31758.
- (27) Sargeson, A. M. The Potential for the Cage Complexes in Biology. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 151, 89–114.
- (28) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. Amphiphilic Metalloaggregates: Catalysis, Transport, and Sensing. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2150–2165.
- (29) Kaur, G.; Singh, P.; Mehta, S. K.; Kumar, S.; Dilbaghi, N.; Chaudhary, G. R. A Facile Route for the Synthesis of Co, Ni and Cu Metallic Nanoparticles with Potential Antimicrobial Activity Using Novel Metallosurfactants. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, 404, 254–262.
- (30) Kaur, R.; Mehta, S. K. Metallomicelle Templated Transition Metal Nanostructures: Synthesis, Characterization, DFT Study and Catalytic Activity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19 (28), 18372–18382.

- (31) Griffiths, P. C.; Fallis, I. A.; Tatchell, T.; Bushby, L.; Beeby, A. Aqueous Solutions of Transition Metal Containing Micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2008**, *144* (1–2), 13–23.
- (32) Ascierto, P. A.; Marincola, F. M. Combination Therapy: The next Opportunity and Challenge of Medicine. *J. Transl. Med.* **2011**, *9* (1), 2–4.
- (33) Mokhtari, R. B.; Homayouni, T. S.; Baluch, N.; Morgatskaya, E.; Kumar, S.; Das, B.; Yeger, H. Combination Therapy in Combating Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8* (23).
- (34) Kostova, I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (9), 1085–1107.
- (35) BLUM, R. H.; CARTER, S. K. Adriamycin A New Anticancer Drug with Significant Clinical Activity. *Ann. Intern. Med.* **1974**, *80* (2), 249–259.
- (36) Carter, S. K.; Blum, R. H. New Chemotherapeutic Agents ... Bleomycin and Adriamycin. *CA Cancer j. clin* **1974**, *24*, 322–331.
- (37) Aubel-Sadron, G.; Londos-Gagliardi, D. Daunorubicin and Doxorubicin, Anthracycline Antibiotics, a Physicochemical and Biological Review. *Biochimie* **1984**, *66* (5), 333–352.
- (38) Swift, L. P.; Rephaeli, A.; Nudelman, A.; Phillips, D. R.; Cutts, S. M. Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death. *Cancer Res.* **2006**, *66* (9), 4863–4871.
- (39) Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (5), 421–433.
- (40) Cutts, S. M.; Nudelman, A.; Rephaeli, A.; Phillips, D. R. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life* **2005**, *57* (2), 73–81.
- (41) Pérez-Arnaiz, C.; Busto, N.; Leal, J. M.; García, B. New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (5), 1288–1295.
- (42) Frederick, C. A.; Williams, L. D.; Ughetto, G.; van der Marel, G. A.; van Boom, H. J.; Rich, A.; Wang, A. H. J. Structural Comparison of Anticancer Drug-DNA Complexes: Adriamycin and Daunomycin. *Biochemistry* **1990**, *29* (10), 2538–2549.

Capítulo 8º.

Conclusiones

Una vez realizados los estudios se puede concluir:

- 1- Los metalosurfactantes sintetizados, RuC1C11, RuC1C19, RuC11C11 y RuC19C19, presentan dos concentraciones micelares críticas:
 - a) La CMC corresponde con la formación de micelas esféricas
 - b) La CMC* corresponde con la formación de micelas elongadas.La CMC es siempre menor que la CMC*.
- 2- Los monómeros de los metalosurfactantes interaccionan con el ADN. La formación de agregados premicelares o hemimicelas en la superficie del polinucleotido provoca un cambio conformacional de este, desde una forma elongada a una forma compacta. Este proceso de condensación es el resultado de atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Estas últimas son las responsables de que el ADN se compacte en presencia de concentraciones más bajas de los tensioactivos con cadenas hidrocarbonadas más largas.
- 3- Los metalotensioactivos interaccionan con las α -, β -, y γ -ciclodextrinas formando complejos de inclusión estables, denominados pseudorrotaxanos, donde las cadenas alifáticas de los tensioactivos se localizan en el interior hidrofóbico de la cavidad de las ciclodextrinas.
- 4- Las micelas de los metalosurfactantes interaccionan con el ADN. Originan la compactación total de este salvo en el caso del RuC1C11, para el que la compactación es sólo parcial.
- 5- Se han preparado dos tipos de liposomas mixtos formados por DOPE y RuC11C11 o RuC19C19. Se ha comprobado que los dos liposomas, a diferentes composiciones, provocan la compactación del ADN, formando

lipoplejos. La compactación viene acompañada de una inversión de la carga de los complejos formados.

- 6- Se han realizado estudios de viabilidad celular para los monómeros, micelas y liposomas de los metalosurfactantes, obteniéndose distintos resultados:
- a) Las líneas celulares estudiadas en presencia de los monómeros de los tensioactivos muestran una viabilidad celular elevada, aunque a altas concentraciones de monómeros la viabilidad disminuye. La citotoxicidad es menor para los tensioactivos que tienen dos cadenas alifáticas en su estructura.
 - b) La viabilidad celular en presencia de micelas es relativamente baja, en especial para los tensioactivos con una cadena y para la línea celular de cáncer de mama.
 - c) Para los liposomas se observa que a concentraciones intermedias la línea celular sana prácticamente no se ve afectada, con una viabilidad cercana al 100%, mientras que para el resto de líneas esta viabilidad es baja. A concentraciones altas de liposomas la citotoxicidad es elevada para todas las líneas celulares investigadas.

Según estos resultados los monómeros podrían utilizarse como vectores para su empleo en terapia génica, mientras que los metaloliposomas y las metalomicelas no serían adecuados para este uso.

7.- Las micelas formadas por los tensioactivo RuC11C11 y RuC19C19 muestran una alta internalización celular para las líneas celulares estudiadas en esta tesis.

8.- Tanto los metaloliposomas como las metalomicelas muestran una capacidad elevada para encapsular el medicamento antineoplásico

doxorrubicina. Esto permitiría utilizarlos como nanotransportadores en tratamientos contra el cáncer donde se use una combinación de fármacos.

Curriculum científico del autor

Publicaciones en revistas científicas:

Lopez-Lopez, M.; Montilla, F.; Olivares, M.; Lebron, J. A.; Moya, M. L.; Lopez-Cornejo, P. Interaction between Monomers of Two Surfactants Derived from the $[\text{Ru}(2,2'\text{-Bpy})_3]^{2+}$ Complex and α , β and γ -Cyclodextrins: Formation of [2]- and [3]-Pseudorotaxanes. *Dalt. Trans.* 2013, 42 (17), 6171.

Sanchez, F.; Barrios, A.; Lopez-Lopez, M.; Lopez-Cornejo, P.; Bernal, E.; Sarrion, B.; Lebron, J. A.; Marchena, M. A New Formulation for Quenching Processes under Restricted Geometry Conditions in the Slow Exchange Limit. *Prog. React. Kinet. Mech.* 2014, 39 (2), 151–170.

Bernal, E.; Lebrón, J. A.; Burgos, F. S.; Lopez-Lopez, M. A Simple Model for the Behavior of Multisite Receptors in Photochemical Processes. *RSC Adv.* 2014, 4 (54), 28707–28713.

Bernal, E.; Lebron, J. A.; Sarrion, B.; Lopez-Cornejo, P.; Carmona, C.; Burgos, F. S.; Lopez-Lopez, M. Fluorescence Quenching of 1-Pyrene-Carboxaldehyde by Iodide Ions in the Presence of Anionic (SDS) and Cationic (CTAC) Micelles: A Quantitative Treatment. *RSC Adv.* 2015, 5 (58), 46485–46492.

Lebrón, J. A.; Ostos, F. J.; Moyá, M. L.; López-López, M.; Carrasco, C. J.; López-Cornejo, P. Cooperative Interaction between Metallosurfactants, Derived from the $[\text{Ru}(2,2'\text{-Bpy})_3]^{2+}$ Complex, and DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015, 135, 817–824.

Ostos, F. J.; Lebron, J. A.; Moyá, M. L.; Deasy, M.; López-Cornejo, P. Binding of DNA by a Dinitro-Diester Calix[4]Arene: Denaturation and Condensation of DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015, 127, 65–72.

López-López, M.; López-Cornejo, P.; Lebrón, J. A.; Ostos, F. J.; Moyá, M. L. Binding and Reactivity under Restricted Geometry Conditions: Applicability of the Pseudophase Model to Thermal and Photochemical Processes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2017, 32, 23–28.

Ostos, F. J.; Lebrón, J. A.; Moyá, M. L.; López-López, M.; Sánchez, A.; Clavero, A.; García-Calderón, C. B.; Rosado, I. V.; López-Cornejo, P. P-Sulfocalix[6]Arene as Nanocarrier for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Chem. - An Asian J.* 2017, 12, 679–689.

López-López, M.; López-Cornejo, P.; Martín, V. I.; Ostos, F. J.; Checa-Rodríguez, C.; Prados-Carvajal, R.; Lebrón, J. A.; Huertas, P.; Moyá, M. L. Importance of Hydrophobic Interactions in the Single-Chained Cationic Surfactant-DNA Complexation. *J. Colloid Interface Sci.* 2018, 521, 197–205.

Índice de Esquemas.

Esquema 1.1. Modelo de nanotransportador de medicamentos, calixareno A) y micelas B).	8
Esquema 1.2. Introducción del material genético en el núcleo de una célula y las barreras fisiológicas que se pueden encontrar para este proceso.	12
Esquema 1.3. Estructura de un nucleótido general además de las bases nitrogenadas que forman para el ADN y ARN.	14
Esquema 1.4. Estructura de las distintas conformaciones que pueden adquirir el ADN.	15
Esquema 1.5. Imagen general de un plásmido.	17
Esquema 1.6. Lípidos complejos.	20
Esquema 1.7. Lípidos simples.	21
Esquema 1.8. Asociación de los fosfolípidos para la formación de la membrana plasmática de una célula.	22
Esquema 1.9. Estructura típica de un tensioactivo gémini cuya cabeza es un grupo amonio cuaternario.	24
Esquema 1.10. Moléculas anfifílicas en disolución acuosa.	25
Esquema 1.11. Tipos de agregados que pueden adquirir los tensioactivos: A) micelas directas; B) micelas inversas; C) micelas cilíndricas y D) vesículas o liposomas.	26
Esquema 1.12. Interacción de los monómeros de tensioactivo con el ADN. A) Baja concentración de tensioactivo; B) Aparición de los primeros agregados premicelares o hemimicelas; C) Aumento de la presencia de estos agregados y primeras variaciones apreciables en el tamaño del polinucleótido; D) Estructura de ovillo del ADN compactado.	35
Esquema 1.13. Diferentes métodos para la decompactación del ADN empleando diferentes tipos de moléculas. A) Método que emplea	38

tensioactivos neutros. B) Método que emplea tensioactivos aniónicos. C) Método que emplean moléculas macrocíclicas como las ciclodextrinas.

Esquema 1.14. Estructura de la ciclodextrina donde n puede ser igual a 6, 7 o 8. 39

Esquema 1.15. Decompactación del polinucleótido por la interacción de los contraiones con los tensioactivos. 40

Esquema 1.16. Decompactación del ADN mediante el uso de concentraciones altas de tensioactivos catiónicos, esto se puede deber a dos efectos: A) Cambio estructural de los agregados formados en la superficie del polinucleótido. B) Que sea más favorable la formación de las micelas que las correspondientes hemimicelas en la superficie del ADN. 41

Esquema 1.17. Interacción de una hebra de ADN con los agregados micelares. Éstos agregados son de tensioactivo catiónico. 42

Esquema 2.1. Estructura de los metalosurfactantes derivados de Ru (II) empleados en esta tesis. 57

Esquema 3.1 ejemplo de máquinas moleculares: A) catenano; B) pseudorotaxano; C) rotaxano. 82

Esquema 3.2. Estructura de la ciclodextrina. 83

Esquema 3.3. Estrategia modelo para la síntesis de catenanos, rotaxanos y pseudorotaxano. 85

Esquema 3.4. Formación de un pseudorotaxano para el caso del tensioactivo RuC1C19 con β -CD. A) entrada de una primera molécula de ciclodextrina en la cadena alifática del tensioactivo y formación del [2]-pseudorotaxano y B) entrada de una segunda ciclodextrina para la formación del complejo [3]-pseudorotaxano. 102

Esquema 3.5. Posibles localizaciones de los anillos de ciclodextrinas en las cadenas alifáticas de los metalosurfactantes. 103

Esquema 4.1. Cambio conformacional del polinucleótido en presencia de monómeros de un tensioactivo catiónico. 117

Esquema 4.2. Diferentes etapas involucradas en un proceso de terapia génica empleando tensioactivos como vectores.	119
Esquema 5.1. Encapsulación de ADN plasmídico, pADN, en el interior de una micela polimérica.	155
Esquema 5.2. A) Tensioactivos géminis empleados en el trabajo. B) Formación de los complejos entre el ADN y los distintos agregados.	156
Esquema 5.3. Agregación de los monómeros de tensioactivos catiónicos derivado de calixareno y la formación del complejo con el ADN.	157
Esquema 5.4. Transformación de micelas esféricas a elongadas en: A) en disolución, B) en la superficie del polinucleótido.	170
Esquema 6.1. Estructura de un liposoma catiónico como vector de medicamentos polares y apolares.	192
Esquema 6.2. Fotografías del extrusor manual usado	195
Esquema 6.3. Representación gráfica a nivel molecular del proceso de extrusión	196
Esquema 7.1. Estructura de la doxorubicina.	230

Índice de Figuras.

Figura 3.1. Espectro de emisión de los cuatro metalosurfactantes y del complejo metálico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.	89
Figura 3.2. Determinación de la CMC de los distintos metalosurfactantes.	90
Figura 3.3. Variación de la CMC en presencia de las tres ciclodextrinas para los distintos tensioactivos: A) RuC11C11, B) RUC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19. () α -CD, () β -CD, () γ -CD.	92

Figura 3.4. RMN bidimensional ROESY del tensioactivo RuC1C11 con α -ciclodextrina. A) Señal de todos los protones, B) ampliación de la zona de interés	94
Figura 3.5. Dependencia de la intensidad de emisión relativa de fluorescencia de los metalotensioactivos de la concentración de CD. Los gráficos A), E), e I) corresponden a la interacción de las ciclodextrinas con el tensioactivo RuC11C11; B), F), y J) para RuC1C11; C), G), y K) para RuC19C19; y D), H), y L) para RuC1C19.	97
Figura 3.6. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para el tensioactivo RuC11C11 en presencia de α -CD a distintas concentraciones del anillo. A) zona de bajada de IE, B) zona constante de IE y C) zona de aumento de la IE.	107
Figura 3.7. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para el tensioactivo RuC19C19 en presencia de α -CD a distintas concentraciones del anillo. A) zona de bajada de IE, B) zona constante de IE y C) zona de aumento de la IE.	107
Figura 4.1. Variación de la intensidad de emisión del bromuro de etidio relativa a la concentración de tensioactivo con el valor de X para los distintos tensioactivos sintetizados.	124
Figura 4.2. Dependencia de la elipticidad molar relativa de EB ($\lambda = 309$ nm) con la relación molar X.	126
Figura 4.3. Espectro de fluorescencia del complejo tensioactivo/ADN a diferentes valores de X.	127
Figura 4.4. Evolución de la intensidad de emisión relativa del tensioactivo a diferentes valores de X. A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.	129
Figura 4.5. Variación de la constante de unión, K_b , en función de la concentración de ADN para los distintos tensioactivos: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.	132
Figura 4.6. Variación de la intensidad de emisión relativa del complejo tensioactivo/ADN a diferentes valores de X en presencia de una concentración fija de α -CD para los distintos tensioactivos: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.	134

Figura 4.7. Representación de la dependencia de X_c de la concentración de α -CD. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19. 135

Figura 4.8. Representación de la ecuación de Stern-Volmer en presencia de α -CD, empleando como quencher el ion $S_2O_8^{2-}$. Para el tensioactivo RuC11C11 con $X=0.4$ en ausencia de ciclodextrina. 137

Figura 4.9. Representación gráfica de los valores de KSV relativos frente a X , a diferentes concentraciones de α -CD, para los tensioactivos: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19. $(KSV)_0$ representa la constante de Stern-Volmer en disolución acuosa, en ausencia de ADN. 139

Figura 4.10. Representación de los valores de X_c obtenidos mediante los dos métodos (fluorescencia estática y quenching) frente al logaritmo de la concentración de α -CD. Fluorescencia estática (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19. Quenching (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19 141

Figura 4.11. Imágenes topográficas por AFM de los complejos tensioactivo/ADN formados para los cuatro tensioactivos a distintos valores de X : A) ADN; RuC11C11: B) $X=0.08$; C) $X=0.2$; D) $X=1.5$. RuC1C11: E) $X=0.2$; F) $X=1$; G) $X=2$. RuC19C19: H) $X=0.08$; I) $X=1$. RuC1C19: J) $X=0.5$; K) $X=0.95$; L) $X=3$. 144

Figura 4.12. Imágenes topográfica por AFM del complejo tensioactivo/ADN a una relación de $X=10$. A) RuC11C11 y B) RuC1C11. 145

Figura 4.13. Imágenes de microscopia de fluorescencia confocal para RuC11C11 (A $X=0.08$, B $X=0.40$) y para RuC19C19 (C $X=0.08$, D $X=0.40$) en una escala de 5 μm . 146

Figura 5.1. Representación de valores de intensidad de emisión de fluorescencia de los tensioactivos estudiados a diferentes concentraciones de estos. Las líneas representan el ajuste lineal de la tendencia. Del punto de corte de ambas tendencias lineales se obtiene el valor de CMC*. 163

Figura 5.2. Imágenes de TEM de los dos tipos de agregados encontrados. Micelas esféricas: A) RuC11C11; B) RuC1C11; C) RuC19C19 y D) RuC1C19. Micelas elongadas: E) RuC11C11; F) RuC1C11; G) RuC19C19 y H) RuC1C19. 166

Figura 5.3. Estudio de la variación de la CMC con la concentración de polinucleótido para todos los metalosurfactantes sintetizados: A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19.

Figura 5.4. Variación de la CMC* (cambio estructural) con la adición de ADN. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19. 168

Figura 5.5. Intensidad de emisión relativa del bromuro de etidio en presencia de distintas relaciones molares [tensioactivo]/[ADN], en sistemas micelares de micelas esféricas. () RuC11C11, () RuC1C11, () RuC19C19 y () RuC1C19. 169

Figura 0.1. Intensidad de emisión relativa del bromuro de etidio a diferentes relaciones molares X, la concentración de tensioactivo se encuentra siempre por encima de la CMC*. La línea discontinua muestra la intensidad de emisión relativa del EtBr en ausencia de ADN. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19. 171

Figura 5.7. Espectro de dicroísmo circular del bromuro de etidio en presencia de ADN. 173

Figura 5.8. Variación de la elipticidad molar relativa del bromuro de etidio a diferentes relaciones molares X para concentraciones de tensioactivo por encima de la CMC*. La línea discontinua indica la intensidad de emisión relativa del EtBr en ausencia de ADN. (●) RuC11C11, (●) RuC1C11, (●) RuC19C19 y (●) RuC1C19. 175

Figura 5.9. Imágenes topográficas por AFM del ADN en ausencia (A) y en presencia de RuC1C11 (B, X=0.8) y de RuC19C19 (C, X= 0.8). 176

Figura 5.10. Variación de los valores de ζ frente a X, en la región de concentraciones de tensioactivo donde se forman micelas elongadas. 177

Figura 5.11. Imágenes de electroforesis de disoluciones de ADN ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) con distintas concentraciones de tensioactivos, siempre por encima de la CMC*. El pocillo M contenía una disolución micelar en ausencia de ADN. A) RuC11C11, B) RuC1C11, C) RuC19C19 y D) RuC1C19. 180

Figura 5.12. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal para el RuC11C11 (A X=0, B X=0.25, C X=1.2) y para RuC19C19 (D X=0, E X=0.25, F X=1.2) en presencia y ausencia de ADN con una escala de 5 μm . 182

Figura 6.1. Variación del tamaño de los liposomas con respecto al valor del parámetro α , es decir, conforme varía la composición de los mismos. 199

Figura 6.2. Ejemplos de la variación de la absorbancia del lipoplejo ($\lambda = 456 \text{ nm}$) a diferentes valores de L/D , para diferentes α . Para RuC11C11; A) $\alpha = 0.2$ y B) $\alpha = 0.8$ y para RuC19C19; C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.8$ 202

Figura 6.3. Ejemplos de la variación de la intensidad de emisión relativa a la masa de tensioactivo catiónico del lipoplejo ($\lambda = 617 \text{ nm}$) a diferentes valores de L/D y α , al aumentar la masa total de lípido. Para RuC11C11; A) $\alpha = 0.2$ y B) $\alpha = 0.8$ y para RuC19C19; C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.8$. 203

Figura 6.4. Dependencia de las constantes aparentes de formación del lipoplejo, obtenidas a partir de datos de fluorescencia, del valor de α . 204

Figura 6.5. Representación del potencial Zeta en orden creciente de L/D , donde: () $\alpha = 0.2$, () $\alpha = 0.4$, () $\alpha = 0.5$, () $\alpha = 0.6$, () $\alpha = 0.7$ y () $\alpha = 0.8$ para A) RuC11C11 y B) RuC19C19 207

Figura 6.6. Representación del tamaño en orden creciente de L/D , donde: () $\alpha = 0.2$, () $\alpha = 0.4$, () $\alpha = 0.5$, () $\alpha = 0.6$, () $\alpha = 0.7$ y () $\alpha = 0.8$ para A) RuC11C11 y B) RuC19C19 210

Figura 0.2. Comparación de los resultados obtenidos por potencial Zeta y tamaño de partículas. 211

Figura 6.8. Imágenes de los liposomas A) y C), con un tamaño medio de 240 ± 80 y $220 \pm 60 \text{ nm}$ respectivamente, y el lipoplejo B) y D), con un tamaño medio de 160 ± 30 y $180 \pm 50 \text{ nm}$. Donde A) y B) son para agregados con RuC11C11 y C) y D) para RuC19C19. 212

Figura 6.9. Espectro característico del B-ADN por dicroísmo circular. 213

Figura 6.10. Variación de espectro de dicroísmo circular del ADN a diferentes valores de L/D . para RuC11C11: A) $\alpha = 0.2$; C) $\alpha = 0.5$; E) $\alpha = 0.8$ y para RuC19C19: B) $\alpha = 0.2$; D) $\alpha = 0.5$ y F) $\alpha = 0.8$. 215

Figura 6.11. Imágenes topográficas de AFM de los lipoplejos de $\alpha = 0.2$ para los dos metalosurfactantes: RuC11C11: A) $L/D = 2$ y C) $L/D = 11$ y RuC19C19 B) $L/D = 2$ y D) $L/D = 11$. 216

Figura 6.12. Fotografías de las electroforesis realizadas para los lipoplejos con tensioactivo catiónico: RuC11C11; A) $\alpha = 0.2$, B) $\alpha = 0.8$ y RuC19C19; C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.8$. 217

Figura 7.1. Resultados de viabilidad celular para la línea celular sana RPE-1, y para las líneas cancerígenas A549, HepG-2, LS180 y MCF-7 para los monómeros de los metalosurfactantes (●) RuC11C11, (●) RuC11C11, (●) RuC1C19 y (●) RuC19C19. 235

Figura 7.2. Resultados de viabilidad celular para la línea celular sana RPE-1, y para las líneas cancerígenas A549, HepG-2, LS180 y MCF-7 para los agregados micelares de los metalosurfactantes (●) RuC11C11, (●) RuC11C11, (●) RuC1C19 y (●) RuC19C19. 237

Figura 7.3. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia relativa de la doxorubicina con la concentración de metalosurfactante. La línea continua corresponde al valor de la CMC del tensioactivo. 239

Figura 7.4. Evolución de la concentración de fármaco externo al saco de diálisis con el tiempo para las micelas formadas por el tensioactivo RuC11C11. 240

Figura 7.5. Microscopía de fluorescencia de las líneas celulares MCF7, LS180, HepG2, A549 y RPE-1 expuestas a micelas de RuC11C11 o micelas de RuC19C19 durante 24 horas, lavadas, fijadas y montadas en un portamuestra. La fluorescencia dentro de las células se determinó usando un filtro de excitación a 470-490 nm y un filtro de paso largo de emisión a 520 nm. 242

Figura 0.3. Viabilidad celular de los liposomas formados por RuC11C11 con: A) $\alpha = 0.2$ y B) $\alpha = 0.8$. Y los formados por RuC19C19 con: C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.7$. 245

Figura 7.7. Evolución de la concentración de fármaco externo al saco de diálisis con el tiempo para liposomas formados por RuC11C11, a dos composiciones distintas A) $\alpha = 0.2$ y B) $\alpha = 0.8$. Y para los formados por RuC19C19, C) $\alpha = 0.2$ y D) $\alpha = 0.7$. 247

Índice de Tablas.

Tabla 1.1. Una clasificación de los métodos de transporte según la naturaleza del proceso.	10
<i>Tabla 1.2. Clasificación de los liposomas según su tamaño y número de bicapas.</i>	30
Tabla 3.1. Muestra los valores de CMC para los distintos tensioactivos.	91
Tabla 3.2. Valores de las constantes de interacción para la formación de los complejos de inclusión con diferentes estequiometrías.	100
Tabla 4.1. Valores de X_c en función de la concentración de α -CD para los cuatro metalosurfactantes preparados.	134
Tabla 5.1. Valores de CMC y CMC* de los metalosurfactantes de Ru(II).	163
Tabla 5.2. Valor medio de los diámetros para las micelas esféricas (E) y cilíndricas o elongada (C).	165
Tabla 6.1. Valores teóricos de la relación L/D, correspondientes al punto de electroneutralidad, para los diferentes liposomas preparados según la composición α .	197
Tabla 6.2. Valores de L/D de electroneutralidad experimentales obtenidos a partir de medidas de potencial Zeta para los diferentes α .	206
Tabla 6.3. Carga de los tensioactivos para cada composición α calculada a partir de medidas de potencial Zeta (pZ) y tamaño.	209
Tabla 7.1. Valores de porcentajes de eficacia de encapsulación para las distintas metalomicelas.	241
Tabla 7.2. Valores de los porcentajes de eficacia de encapsulación para los distintos metaloliposomas con distinta composición.	247